التحليلات البيولوجيّة الدقيقة

الجزء الثانى

علم طرائق التحليل

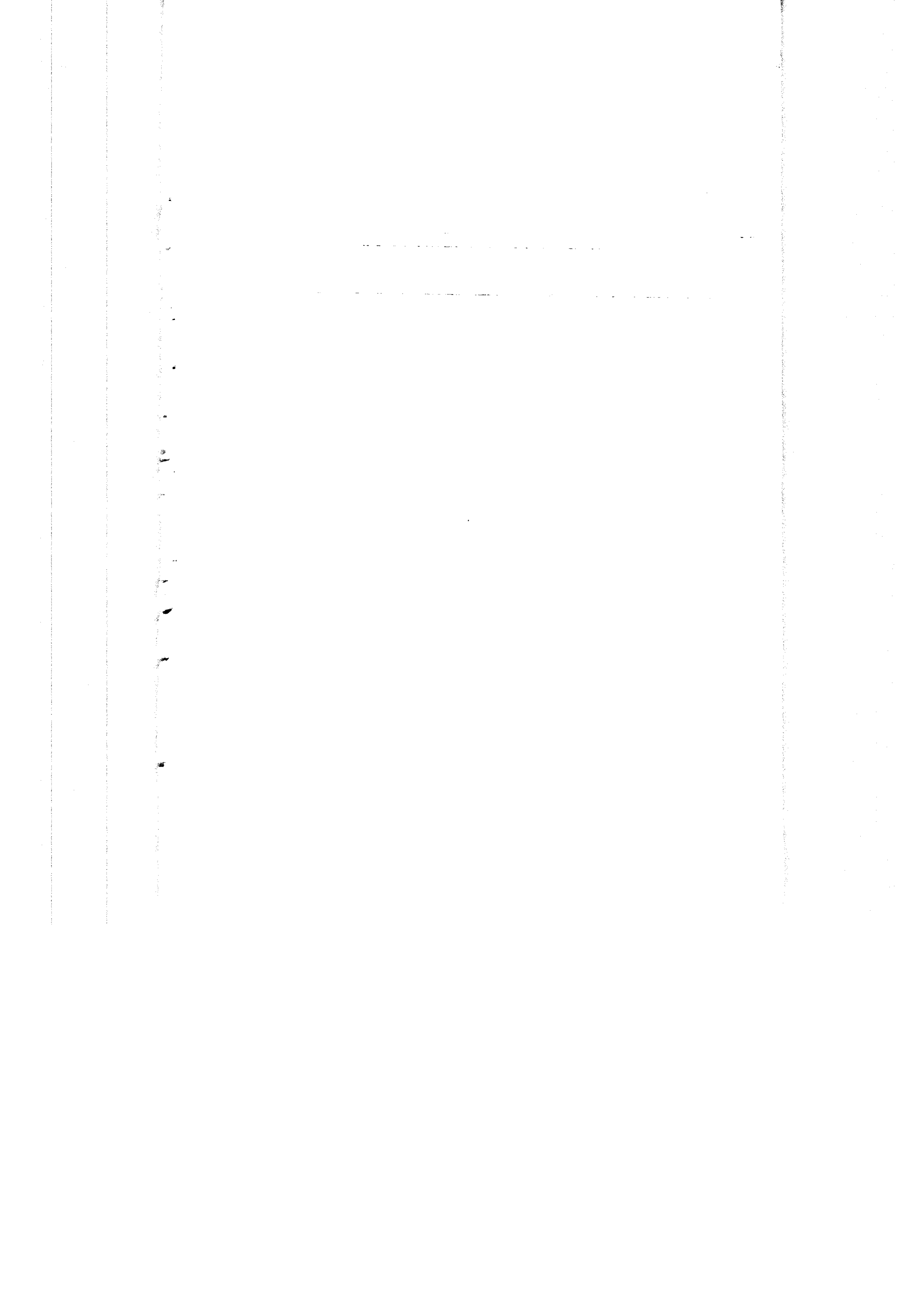
تأليف

دكتور

خمساوى أحمد الخمساوى

أستاذ مساعد بقسم الانتاج الحيوانى

كلية زراعة الأزهر



مقدمة

بسم الله الرحمن الرحيم

سبق أن تناولنا فى الجزء الأول من هذا الكتاب أساليب وأجهزة القياس ، وفى هذا الجزء سوف نعرض الأسس العامة لطرق التحليلات البيولوجية الدقيقة وهو مايعرف بعلم طرائق التحليل Methodology وكما أشرنا فى الجزء الأول فان هذا العلم يتناول كيفية تصميم الطرق التى تمكن من الاستفادة من تكنولوجيا التحليلات المختلفة لتقدير مادة معينة فى عينات معينة ، سواء كانت هذه المادة عنصرا كيماويا أو مركبا معدنيا أو عضويا أو مركبا حيويا نباتيا أو حيوانيا ، وسواء كانت العينات المراد تحليلها أخذت من داخل الخلايا أو من خارجها أو فى أى وسط كان .

وقد افردنا الباب الأول منه للعمليات والقواعد المتبعه فى معامل التحليل ، والباب الثانى لضبط نوعية التحليل ، والثالث لطرق التعامل مع العينات قبل تحليلها . بينما الأبواب الباقية خصصت لطرق التحليل المختلفة التى أوردناها هنا كنموذج لطرق التحليل فى كل مجال وذلك على سبيل التمثيل وليس الحصر ، على أن الباحث سيجد هناك فى كل باب العديد من الطرق التى لم نذكرها

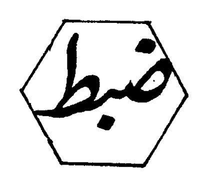
وذلك لأن الدوريات الشهرية والسنوية تضيف الى معارفنا فى كل حين العديد من هذه الطرق لدرجة انه يستحيل حصرها فى مؤلف كما ان حصرها ليس ذا أهمية للباحث لأنه عادة ما يعتمد فى تحليلاته على الطرق المرجعية التى يرجع اليها فى مصادرها الأصلية ٠

وانما الغرض من علم طرائق التحليل هو وقوف الباحث على الأفكار الرئيسية لتصميم الطرق بحيث يتعامل معها من واقع الفهم الكامل لفلسفتها مما يكسبه المرونة عند التعامل معها وكذلك يمكنه من تلافى الوقوع فى العديد من الأخطاء التى تصاحب استخدام طرق معينة وتمكنه من حل المشكلات التى قد تصادفه فى تحليله بينما لاتكون مذكورة تفصيلا فى شرح خطوات الطريقة فى المرجع الاصلى الذى يجدها فيه ٠

والله ولى التوفيق ،

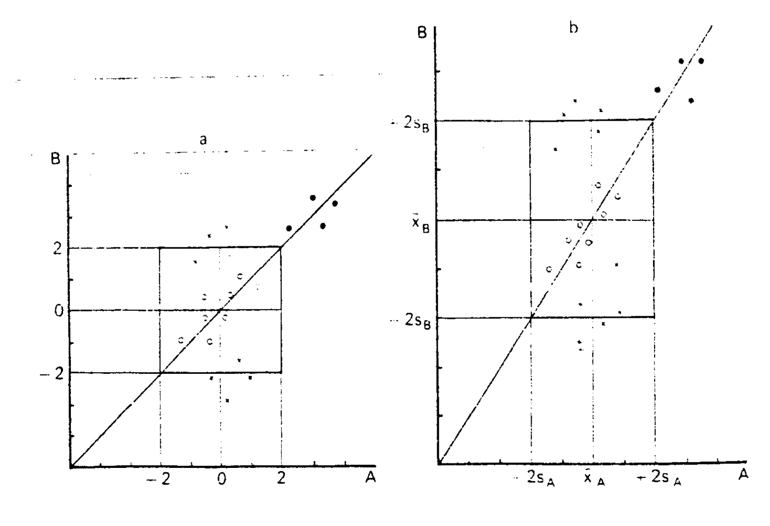
المؤلف

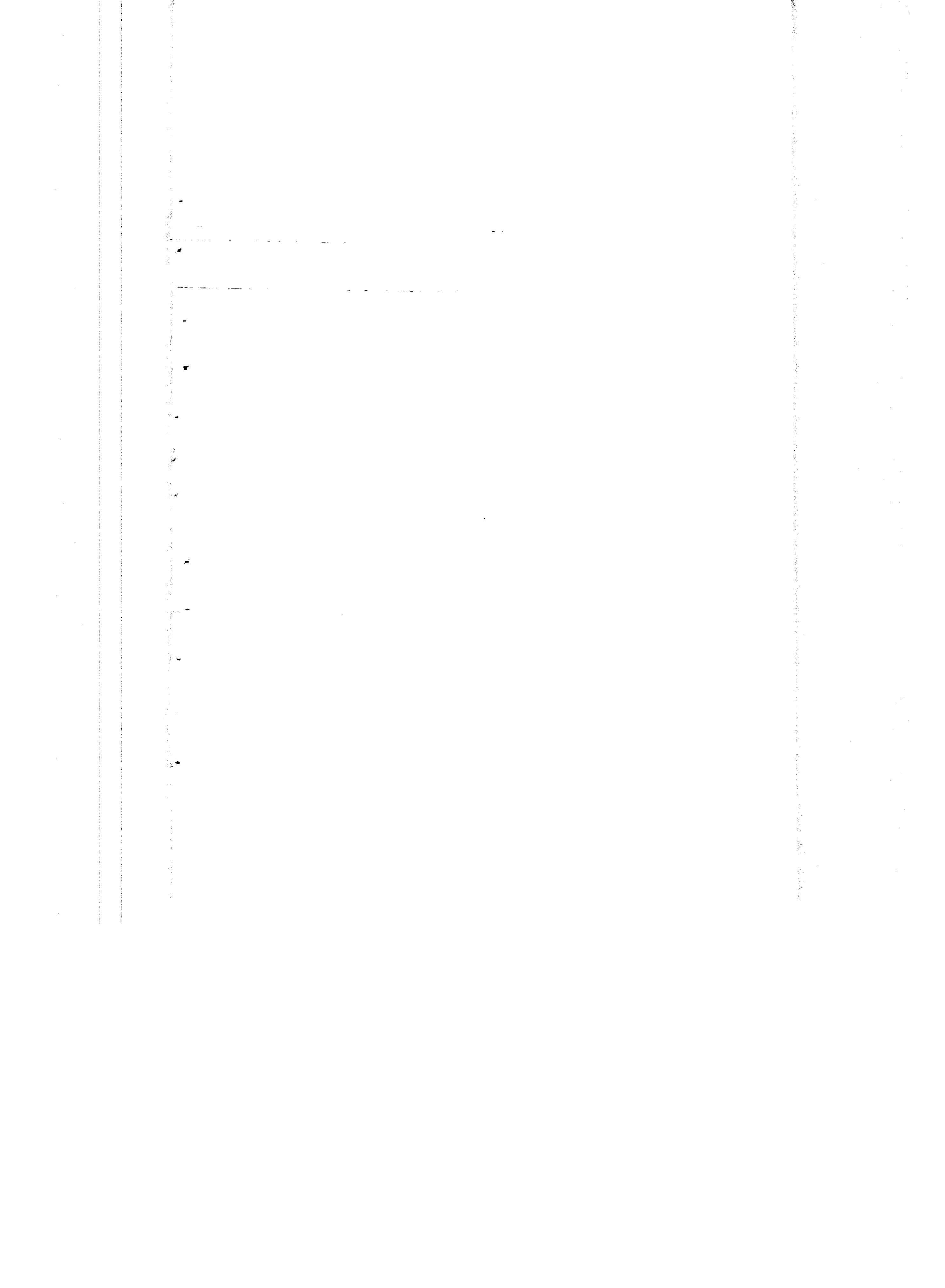
الباب الأول





التحليل





الفصل الأول

نوعية التحليل

مقدمة

يتمثل الدور الرئيسي لمعامل التحاليل البيولوجية في تقدير المواد في أنسجة الجسم وسوائله لأغراض التشخيص الطبي أو دراسة المعاملات البحثية أو لدراسة وتفهم طبيعة العمليات الحيوية في الجسم .

ويمكن القول أن جميع نتائج التحليل التي تتم في أي معمل كيميائي معرضة للخطأ ، ومايجب الحرص عليه أن تكون هذه الأخطاء أقل مايمكن ودراسة هذه الأخطاء مسئولية معامل التحليل اذ يجب أن يحاول المسئولون عن هذه المعامل التعرف عليها وتقليلها او تلافيها .

وسوف ندرسها كل هذه الاخطاء التي تحدث في معمل التحليل منذ استلام العينة وحتى ارسال التقرير بالنتيجة.

كثير من هذه الاخطاء التى تحدث أثناء التحليـــل ترجع للمواد الكيميائية المستخدمة أو الأدوات والأجهزة التى يتم التحليل بها ، كما أن بعض الأخطاء قد يقع فيها القائم علـــى التحليل أثناء وصف النتائج أو أثناء العمليات الحسابيـــة الرياضيـــة ٠

ومن المهم فى مجال ضبط نوعية التحليل اختيـــار التحليل المناسب والطريقة المناسبة للعينة والمادة المراد تحليلها أو التعامل معها وذلك لتقليل هذه الأخطاء ، هذا بالاضـافة الى الاختيار المناسب والموفق للسرعة التى يتم بها التحليل ونوع الجواهر الكاشفة REAGENTS وكذلك أدوات التحليل EQUIPMENTS التى تستخدم فيه ، فضلا عن الاختيـار المناسب لتكنيك التحليل ذاته ٠

ويجدر بنا قبل تناولنا لهذا الموضوع أن نلم ببعـــض المصطلحات التى نستخدمها فى هذا المجال ونوجزها هنا نقـــلا عــــن : "اخصائى التحليل الاكلينيكى الكيماوى الفيدرالى الدولى"

"THE INTERNATIONAL FEDERATION OF CLINICAL EXPERT"
IFCC - EP, BÜTTNER et al, 1975

١ ــ طريقة التحليـــل AN ANALYTICAL METHOD

هى الخطوات التى تتبع والمواد والادوات

التى تستخدم وتكون ضرورية للحصول على النتيجة المطلوبة أو للحصول على القياس الكمى للقيمة المراد معرفتها •

وما يتم فى طريقة التحليل عبارة عن عملية ضبط ومقارنة المواد المراد قياسها بالنسبة لقياس معلوم مسبقا ومعلوم كميا وغالبا ما يتم اجراؤه — وضبطه من خلال الطريقة التحليلية ذاتها •

ويسمى هذا القياس الكمى المعلوم المضبوط ((بالقياسى ، STANDARE))
ويطلق اصطلاح القياسى الضابط أو قياسى التعبير CALIBRATION STANDARD ليعنى معنى محددا فى الكيمياء التحليلية بخلاف معانى الضبط أو القياس فى أى تعريف آخر •

٢ — القياسى المحكم ARBITRARY STANDARD

وفيها يكون القياسى الضابط (قياسى التعبير) محتويا على كمية غير معلومة من

المادة المخصوصة بالقياس ، ويعبر عن المحتوى من
هذه المادة فيها بوحدات متعارف عليها ومـــن
أمثلة ذلك القياسيات الحيوية الدولية وقياسـيات
IMMUNOGLOBUIIN STANDARD

٣ ـ المـــادة القياسية الداخليـــة

INTERNAL STANDARD

وهى مادة لا توجد طبيعيا فى العينة وتخلو
تماما من المادة المراد قياسها وهى تضـــاف
بكمية معلومة الى العينة أو الوكن من العينـــة
والمادة القياسية بغرض تصحيح النتيجة وزيـــادة
دقتهـــــــــا .

٤ ـ المادة القياسية الأولية

PRIMARY STANDARD MATERIAL

وهى مادة معروفة التركيب الكيماوى وتكون
عالية النقاوة وتستخدم فى تحضير المحـــــول
القياسى الأولـــــــــــــــــــــى
PRIMARY STANDARD SOLUTION

حيث يحضر ويعرف تركيزه بالضبط وذلك باذابة وزنة دقيقة من هذه المادة القياسية الأولية في مذيب مناسب ثم اكماله الى حجم أو وزن معلوم.

٥ ـ المحلول القياسي الثانوي

SECONDARY STANDARD SOLUTION

وهو المحلول الذى يستخدم كمقياس تعبير متى أمكن تقدير كمية تركيزه أو محتواه بأى طريقة تحليلية أخرى موثوق بها ولكن لا يمكن تحضيره مباشرة كما في المحلول القياسي الأولى .

معايير الثقة بالطرق التحليلية

أ ـ الدقة ACCURACY

وتعنى مدى اتفاق أفضل تقدير لقيمة تحليل ما وحقيقة هذه القيمة ويتضح من هذا التعريف أن هذا المقياس ليس له قيمة عددية ولكن

القيمة العددية الناتجة عن الفرق بين متوسط مكررات عديدة للمقياس والقيمة الحقيقة له تمثل الخطأ INACCURACY وفى نفس الوقت تعطى الدلالة المطلوبة عن الدقة ٠

وهذا الفرق قد يكون موجبا أو سالبا ويعبر عنه بنفس الوحدات التى يقاس بها القياس أو يعبر عنها كنسبة مئوية من القيمة الحقيقية للقياس ، وقد يعبر عن نفس هذا المعنى بدلالة الخطا باصطلاح الانحراف أو الخطأ القياسى SYSTEMATIC ERROR ٠

ب ـ الضبط PRECISION

وهو عبارة عن الفرق بين قيم مكررات القياس وهى أيضا ليس لها قيمة عددية ، وانما هذا الفرق يدل على قيمة عدم الاحكام أو الخطأ فى الضبط ٠

وتسمى هذه القيمة العددية أو يعبر عنها بالانحراف المعيارى أو معامل الاختلاف لنتائج المكررات التى قيست بنفس الطريقة لنفس القياس ٠

ولابد ان يذكر معها متوسط القيمة المقاسة وعدد مرات القياس وأن توصف معها الطريقة التى أجريت بشكل يمكن اى باحث آخر من

تكرارها ، ويتميز هذا المعيار انه قابل للتجزئ بمعنى انه يمكن عن طريقه مقارنة دقة الضبط بين باحثين أو بين معملين أ و بين يومين أ و بين وقتين لاجراء القياس أو أثناء يوم معين أو فترة زمنية محددة ٠

ويسمى القياس العددى المتحصل عليه من هذا المعيار وهو رقم يدل على الخطأ كما ذكرنا بالخطأ العشوائى ٠

جـ ـ التخصصية SPECIFICITY

وهى قابلية طريقة ما من طرق التحليل لتقدير مركب أو مركبات بعينها دون غيرها لتحقيق القياس المطلوب ٠ وهى ليست ذات قيمة عددية وانما تقدم على مايتاح من أدلة على أن المكونات التى تستخدم فى الطريقة هى التى تحقق النتيجة المرجوة ٠

وعلى العكس من هذا المعنى اصطلاح التداخل INTERFERENCE وهو يعنى اثر المكونات التى لاتحقق بذاتها حصول النتيجة على دقة القياس للمكونات الأخرى ٠

د ـ الحساسية SENSITIVITY

وهى قدرة طريقة تحليل ما على الكشف عن كمية قليلة جدا من

المكون المراد قياسه ، وهي أيضا ليست قيمة عددية ، ولكن القيمة العددية المستخدمة للدلالة عليها انما هي مايمكن تعريفه بحد الكشف للطريقة وهو أقل كمية يمكن تقديرها وقياسها في عينة خام ، ويمكن أن يكون هذا الحد عبارة عن تركيز أو كمية مطلقة ويدل على النقطة التي يصبح التحليل عندها غير ذي جدوى .

هذه المعايير السابقة تساعد على التعرف على المدى التحليلي للطريقة ANALYTICAL RANGE فيما اذا كانت تناسب تحليل ما من عدمه حسبما يتطلب التطبيق العملي المراد من أجله النتيجة .

وهو يحدد ما اذا كانت طريقة ما يمكن استخدامها في تحليل ما دون احداث تعديل أو تطوير من عدمه .

أنواع طرق التحليل بناء على الثقة فيهـــــا

الطرق التحليلية بناء على معايير الثقة المختلفة أنها يمكن حصرها فيما يلـــــــــي :

١ ـ الطريقة القاطعة DEFINITIVE METHOD :

وهى الطريقة التى يتم الوصول اليها بعد بحوث مستفيضة وليس فيها مصدر لخطأ أو غمــــوض .

٢ ـ الطريقــة المرجعية REFERENCE METHOD :

وهى الطريقة التى يتم الوصول اليها ايضا بعــد بحوث مستفيضة ولكنها تنطوى على أخطاء بسيطة يمكـــن اهمالها بالمقارنة بالطرق غير المضبوطة .

٣ ـ الطريقة المعلومة الانحراف METHOD OF KNOWN BIAS

وهى الطريقة التحليلية التى يمكن تقدير كميـــة

انحراف نتيجتها عن القيمة الحقيقية ويمكــن أن يكــون
هذا الانحراف مساويا للصـــــفر .

٤ ــ الطريقة غير معلومة الانحراف

:METHOD OF UN DNOWN BIAS

وهـي الطريقـة غـير معلـومـة الـدقـة .

تـوصـيف قـيم التحليـل

بتطبيق طرق التحليل المختلفة نحصل على قيمة تركيز المــــادة
المراد تحليلها ANALYTE أو المكون المراد قياسه سواء في المحلول
القياسي أو العينة ومقدار الثقة في هذه القيمة يمكن التعبير عنه بالاصطلاحات
التاليـــــة :

١ ــ القيمـة الحقيقية : TRUE VALUE

وهي القيمة الحقيقية للقياس وتقـــــــدر بالطـــرق
الاخــــرى .

٢ ـ القيمة القاطعة :DEFINITIVE VALUE

وهى القيمة التى تقدر بالطريقة التحليلية القاطعة •

٣ ـ القيمة المرجعية : REFERENCE METHOD VALUE

وهى أفضل قيمة يمكن تقديرها للقيمة الحقيقية ويمكن الحصول عليها نتيجة استخدام مكررات عديدة للطرق المرجعية الممكن استخدامها •

٤ ـ القيمة المرجحة : ASSIGNED VALUE

وهى القيمة التى يمكن ترجيحها عن سواها إما اصطلاحيا او بدليل اولى ، ومثال ذلك فى حالة عدم وجود طريقة مرجعية محققة موثوق بها وتوجد بهذا الوصف الغير التى يحصل عليها من طرق تحليلية معلومة او غير معلومة الانحراف •

٥ ـ القيمة الموثقة : CERTIFIED VALUE

وهى القيمة التى توثق من أى جهة رسمية

بمعنى أنها القيمة التى صدقت عليها جهة رســـمية
أو قدرت بهذه الجهـــــة .

٦ ـ القيمة المقدرة STATED VALUE :

وهى القيمة التى تقدر خارج الجهة الرســـمية
وبدون تصديق أو توثيق .

المـــادة الضـــابطـــة

CONTROL MATERIAL

وهى المادة التى تستخدم فى أى غرض من أغراض ضبط نوعية التحليل
سواء على صورة عينة ثابتة أو محلول ثابت .

والعينة الثابتة CONTROL SPECIMEN أو المحلول الضـــابط
CONTROL SOLUTION وهى التى تحلل منفردة بغرض ضبط نوعية
التحليل وليس بغرض حساب القيمة المقاسة . وهى تدخل فى اجراء تحليل
ما ANALYTICAL RUN وتدون المحاولات والفحوص التحليليـــة
المتتابعة التى تمت دون أى اعاقـــات .

والنتائج عادة تحسب من نفس الجواهر الكشافه القياسية الــتى

يتم الحساب والضبط عليها ، ومع ذلك فهذا التعريف قد لايكون تعريفا جامعا ، وفي هذه الحالة يفضل تقييد الاصطلاح باضافة كلمة SERIES لتعني أن هذه المادة أو المحلول هو مادة أو محلول ضابط في هـــــذه التتابعات التحليلية المذكورة في الطريقة بالذات •

وتقسم اجراءات ضبط النوعية الى قسمين همـا :ـ

أولا : ضبط النوعية داخليا INTERNAL QUALITY CONTROL:

وهو مايتم من اجراءات بالاستعانة بالنتـائج المتاحة فقط من معمل واحـــــد •

ثانيــا : ضبط النوعية خارجيا EXLERNAL QUALITY CONTROL:

وهو مايتم من اجراءات بالاستناد ة من نتائـج تحصل عليها من معامل مختلفة أجرت التحليل علـى نفس العينة أو العينـــــات •

مـــواد التعـــيير ومـــواد الضـــــبط

CALIBRATION & CONTROL MATERIALS

الفرق الرئيسى بين استعمال العينات من هاتين المادتين يجب أن يكون واضحا فى اذهاننا تماما ، ولاتوجد عينة يمكن أن تستخدم بهدف التعيير والضبط فى نفـــس الوقت ، فبواسـطة عينـــة التعيـــــير CALIBRATION SAMPLE نحصل على قيمة للمقاس ثم تقارن بهذه القيمة قيمة القياس فى العينات الأخرى سواء كانت عينات الرسالة أو عينـــــات الضبط (الكنترول) .

أما النتائج المتحصل عليها بواسطة عينات الضبط CALIBRATION SAMPLE فهـــى التى تحلل احصائيا لتحديد مقاييس الدقـــة والضبط كوسيلة أو جزء من أساليب الحكم على طريقة التحليل والتعريف بها .

كما ان هناك فرق بين عينات التعيير وعينات الضبط فيما يتعلـــق بالاعداد والتحضير لكل منهما ، وان كانت نقاط وخطوات علمية كثيرة مـــن هذا الاعداد والتحضير تتبع من كليهما .

وفى قياسيات التعيير CALIBRATION STANDARD يجـب ان يوضع تركيبها الكيماوى فى الاعتبار بالنسبه لطريقة التحليل ونوع العينـــات

المراد تحليلها ، فمثلا المحاليل القياسية الأولية في الماء قد تكون مناسبة لبعض التحليلات وغير مناسبة لتحليلات أخرى . بينما المحاليل القياسية الثانوية المكونه من مصل الدم هي التي يجب ان تستخدم دون غيرها في التحليلات الاتوماتيكية متعددة القنوات للعينات امصال الدم .

والمواد الضابطة من الطبيعي ان تكون متشابهة في التركيب الكيماوى للعينات المراد تحليلها وكلاهما يجب ان يكون متجانسا وثابتا .

والقيمة المقدرة STATED VALUE يجب ان تقدر (تقامر) بدقة في كل من مادة التعبير ومادة الضبط ، اذا ما استخدمت هذه القيمة لتحديد درجة الثقة في الطريقة .

والمواد الضابطة الغير مقدرة القيمة تستخدم لدراسة الضبط والتغيير في الدقة بالنسبة لطريقة ما او لمعمل من المعامل .

وطريقة تحضير واعداد المواد الضابطة امر صعب للغاية اذا ما قورن بمواد التعبير اذ غالبا ماتكون هذة الطريقة من الاسرار التجارية ولكن من المهم أن يذكر من المادة كيفية الوصول الى قيمة تحليلية مقدرة لها .

وليس بالضرورة أن تكون في طريقة ما مادة ضابطة واحدة او مادة

تحضير واحدة ، بل ربما كانت لكل عملية تحليلية أو بضعة عمليات مواد ضابطة أو تحضير خاصة بها في نفس الطريقة الواحدة ، فقد يستخدم مثلا سيرم الدم كمادة ضابطة أو كمادة تحضير عند تحليل عينات الدم كما أنه قد تستخدم في نفس الوقت مرشحات DIDYMIUM الزجاجية للتأكد من انضباط جهاز الأطياف الضوئي المستخدم في القياس •

التركيب :

تحضر مواد التحضير من مواد نقية وخاصة اذا ماكانت مواد ذات نقاوة خاصة PURIFIED MATERIALS مثل الأنزيمات ومجزئات البروتين ، كما تحضر أيضا من مواد طبيعية وهي غالبا ماتكون في شكل مركبات •

الاختلاف في الخصائص الطبيعية والكيميائية الراجع لاختلاف الماركات التجارية لكل من القياسيات والمواد الضابطة والعينات المبحوثة يمكن أن تؤثر في صحة نتائج التحليل وذلك بما يسمى بتأثيرات المحتوى MATRIX EFFECTS ومن ثم فان طريقة التحليل المثالية هي التي لاتتأثر بهذه الاختلافات ، ومعظم طرق التحليلات البيولوجية المطبقة مع المواد الحيوية تتأثر بتأثيرات المحتوى التي يمكن أن نقسمها الى :

تأثيرات فيزيقية بسبب : (اللزوجة ـ التوتر السطحي ٠٠٠٠الخ)

تأثيرات كيميائية بسبب : (التداخل ـ عـــدم التخصصية ٠٠٠٠ الخ)

وتأثيرات المحوى يمكن أن تسبب فروقا فى التعيير بـــين قياسيات مائية وأخرى مصلية وفروقا فى الضبط عند استخدام مـــواد ضابطة مائيه وأخرى مصليـــة ٠

تقســـيمها :

ويمكن تقسيم مواد الضبط والتعيير تبعا لاستعمالها او الطرق المستخدمة لتحديد القيم أو التركيب الكيماوى ٠

فمثلا المحلول القياسى الأولى يتحدد تركيبه الكيمـــاوى بطريقة تحضيره وليس بالتحليل الذى سوف يستخدم فيــه ٠

وفى الحالات التى تسمح باستخدامه يعتبر هو أفضـــل الطرق المباشرة لتقدير الدقة ٠ وهو عادة مايستخدم فى الطـــرق المرجعية ٠ REFERENCE METHODS

وفى حالة اعادة تحضير القياسيات الأولية يجب التاكـــد من ثبات المواد الاخرى ، ويجب التاكد من الجوهر الكشـــافه الذى يحضر منه ويجب ان يدرس تأثير التداخر ٠

وفى طرق تحليلية كثيرة نحتاج للتخلص من تأثيرات المحوى الى قياسيات والى عينات ضابطة تحاكى تماما العينات المبحوثة .

ويتم ذلك أحيانا باذابة مادة تحليل نقية فى محــوى مناسب خالية منها تماما ((أو تركيزه فيها غير ذى بال وغـير معنوى)) .

وفى أغلب الأحيان فان المواد الحيوية مثل المصل يعدل تركيزها اذا دعت الحاجة بالاضافة أو التخفيف اذا ما استخدمت كقياسيات ثانوية أو كعينات ضابطة ، وفى هذه الحالة فــان تركيبها الكيماوى يجب أن يتم تقديره بالتحليل .

وقياسيات التعيير تحتاج الى قليل من القيم المرجحـة وذلك لضبط طريقة التحليل التى سوف يستخدم فيها ، اما المادة الضابطة التى تستخدم لتقدير عنصر الضبط فى طريقة ما فيجب ان تشبه العينة المبحوثة ، ويجب ان تكون معدة بعدة تركيزات لمادة التحليل ، بحيث تشمل هذه التركيزات النهاية العليا الـتى تشير الطريقة المرجعية الى عدم تجاوزها وأن تكون قريبة من مدى التحليل وأن تكون متدرجة بفارق صغير ولكن كاف لاحـداث تغيير فى القيـاس .

أما المواد الضابطة التى تستخدم لتقدير عنصر الدقـة

فهي اما أن تكون مادة ضابطة من تلك التي تستخدم لتقدير عنصر الضبط بقيم مرجحة وأما ان تكون قياسي تعبير اولي والاخير يكون مفيدا لكشف التغييرات في الدقة عند استخدام القياسيات الحيوية .

المواصفات :

معظم المواد الضابطة وبعض قياسيات التعيير تجهز في قوارير صغيرة VIALS سواء في صورة سائلة أو مسحوق سريع الذوبان ، ومن المهم جدا أن يكون الفارق بين القارورة والاخرى منخفض جدا ، وذلك يتطلب ان يحدث تجنيس لكمية المادة المحضرة قبل توزيعها على القوارير ، وكذلك حجم المذيب اذا كان اسلوب المسحوق سريع الذوبان هو المستخدم .

والاهتمام بالتركيب وحجم السائل المذيب ضروري في هذه الحالة ويجب ان يزداد هذا الاهتمام عند اعادة تجنيس وخلط محتويات عدة قارورات أو عند حلط محتويات القارورة بالقدر الذي يسمح بثبات مادة التحليل .

وعموما يجب النظر الى التباين الكلي بين القارورات بعد مزجها بحيث لايزيد معامل الاختلاف (CV) لها عن ٢٥ ر٠٪

وهذه القيمة قد تختلف قليلا من شخص الى شـــخص •

ويجب أن تكون المادة ثابتة • ومعظم المواد يوصى معها بذكر مدة الصلاحية فى ظروف التخزين العادية أو فى حالتها بعد اعادة مزجهـــــا •

تحديـد طريقـة التحليـل

عند الشروع فى عمل تحليل فان أول خطوة يجب أن يبدأ بهـــــا الباحث هى اختيار طريقة التحليل المناسبة وتحديدها ومن ثم يجـــب أن تتوفر له المعلومات الكافية عن الطرق المختلفة حتى يمكن مقارنتها واختيار افضلها مناسبة للتحليل المطلوب وهذه المعلومات تتمثل فيما يلـــى :

١ - وصف الطريقة METHOD DESCRIPTION :

ويجب أن تحتوى على معلومات واضحة عن النقاط التاليـــة :

أ - الأسس التى بنيت عليها الطريقة او الاطار العام لها •

ب - خصائص الجواهر الكاشفة المستخدمة ، والادوات ، والاجهزة الاخرى التى يحتاج اليها •

جـ ـ طريقة تحضير قياسى التعيير CALIBRATION STANDARD وكيفية الوصول الى القيمة القياسية .

د ـ الاحتياجات من : العينة (حجم العينة) ـ المواد الحافظة ـ مضادات التجلط (مثلا) .

هـ ـ الوصف الكامل لخطوات الاجراء وخاصة الخطوات الحرجة التى قد تكون أكثر عرضة للخطأ أو التى تتحقق فيها النتيجة أو التى تحتاج الى خبرة وعناية عند اجرائها مع ذكر حدود السماح للقياسات المستخدمة فى وصف الطريقة .

و ـ اجراءات التعيير وحساب النتيجة وتعبيرها .

ز ـ المدى التحليلى ANALYTICAL RANGE

ح ـ احتياطات الأمان .

٢ ـ امكانية اجراء الطريقة PRACTICABILITY :

وهناك جوانب عديدة يجب أن تكون واضحة حتى يمكن على ضوئها تحديد الطريقة المناسبة منها :

أ ـ سرعـة الطريقـــة :

وهى تقاس بالوقت اللازم لتحليل عينـــة واحدة سواء على اختبار أن مواد التحليل قد سبق تحضيرها أو لم تحضر من قبل كما تقاس أيضا بعدد العينات التى يمكن تحليلها فى وحدة زمن مناسبة فاذا كانت سرعة الطريقة تختلف وتتباين عنـــد التحليل لأى سبب (نوع العينة ـ وقت التحليل امكانية العمل ..... الخ) فان ذلـــك يؤثر على دقة الطريقة أو احكامها .

ب ـ التكلفـــــــة :

وهى صعبة التقديـر ، وتشـــمل :

رأس المال ، أجور العمـــــالة
أسعار المواد الكيميائية الكاشـــفة
الاستهلاكات ، تكاليف الاصلاح والصيانة
... ومنها تحسب تكلفة العينــــة
الواحدة .

ج ـ مهـارة الأداء :

احتياجها الى مهارة تقنية وان كانـت
هذه المواصفة مواصفة شخصية يصعب الحكـم
عليها ، لكن من الممكن وضعها رقميا بوضـع
درجات مستوى لمن يصلح للقيام بهـذا
التحليـل .

د ـ الاعتمادية : DEPENDABILITY

مدى الاعتماد على الطريقة من المواصفات
المحددة لامكانية اجراء الطريقة ويمكن ملاحظتها
عن طريق الاحتفاظ بسجل لأعطال الأجهـزة
والمعدات المستخدمة فى الطريقة .

هـ ـ الأمـان :

ويشمل تحديد المخاطر الكهربيـة
والميكانيكية و الكيماوية والميكروبية للطريقة .

٣ ـ امكانية ضبط واحكام الطريقة : PRECISION

ذكرنا سابقا أن معيار انضباط الطريقة يمكن تحديده باجراء التحليل على عدد من المكررات تحت نفس الظروف ، وبالاضافة الى الأخطاء العشوائية فان احكام الطريقة يتأثر باستعمال عينات مختلفة أو تركيزات مختلفة أو مرات تحليل مختلفة أو أيام مختلفة أو دفعات مختلفة من الجواهر الكاشفة والقياسيات والأدوات ومواد التحليل .

ومع أن الحكم على نوعية التحليل يتطلب دراسة كل هذه العوامل الا أنه عند تحديد طريقة التحليل يكفى على الأقل التأكد من أن هذه العوامل سوف تكون ثابتة أثناء تحليل معين ، وعند قياس مكررات عينة لا يجب أن نتوهم حصولنا على نفس القيمة الحقيقية ولكننا نحصل على قيم متباينة حول هذه القيمة .

للحصول على أصدق قيمة منها هناك أسلوبين :

الأول : تحليل مكررين لعدد كبير مختلف من العينات .

الثاني : تحليل مكررات عديدة لعدد قليل من العينات .

مع ملاحظة أن يفصل بين كل تحليل للمكرر
والذى يليه بفاصل زمنى غالبا مايكون يوم ، كما يجب
ملاحظة أن ترتيب المكررات داخل العمل التحليلى
يجب أن يكون عشوائيا .

أخطاء الضبط داخل العمل التحليلى

WITHIN - RUN IMPRECISION :

قياس أخطاء الضبط داخل العمل
التحليلى تعد وسيلة سريعة للحكم على انضباط
طريقة التحليل أو للمقارنة بين طريقتين
ـ مثال ذلك تحليل حوالى ١٠٠ عينة بمكررين
عشوائيين بطريقتى التحليل .

أخطاء الضبط بين أيام التحليل

BETWEEN - DAY IMPRECISION :

وفيها تجرى التحليل لمكررات فى فترات
مختلفة من الوقت المراد اختياره ، فمثلا
تحليل واحد يوميا لمدة ٢٠ يوما متقاربة

أو متتالية ، ويفضل أن يجرى ذلك بنفس
الروتين المعتاد للعمل وبنفس الظروف وبنفس
القائمين بالتحليل ويحسب منها الانحراف
المعيارى ومعامل الاختلاف وفى جميع الاحوال
يجب الا يزيد مقدارها عن ضعف مقدارها عند
قياسها على أخطاء الضبط داخل اليوم الواحد •

٤ ــ تحديد الدقة ومراقبتها :

تحديد ومراقبة الدقة مسألة أكثر صعوبة من
تحديد ومراقبة الضبط وذلك لصعوبة أو استحالة معرفة
القيمة الحقيقية للقياس المراد تحليله فى العينة
واذا كانت طريقة ما من طرق التحليل المراد الحكم
عليها غير دقيقة لزم الأمر اجراء اختبارات اضافية
لتحديد هذا الخطأ فى الدقة •

والمقارنة الأساسية تكون بين الطريقة المراد
اختبارها وبين طريقة أخرى معلومة الدقة •

الفصل الثانى

الاخطاء في القياسات التحليلية

الهفوة والخطأ ه

لابد أن تحدث هفوات أثناء العمليات والقياسات التحليلية فنرى مثلا أن قسما من الراسب يذوب ويضيع أثناء غسله كما تكون الكتلة الحاصلة لدى وزن مادة ذات قابلية لامتصاص رطوبة الجو ((الاسترطابية)) أعلى بقليل من الكتلة الحقيقية وأخيرا يؤدى عدم دقة جهاز القياس الى الحصول على نتائج غير صحيحة .

ويستطيع المحلل الكيميائى أن يأخذ بعين الاعتبار قسما من الهفوات المرتكبة حيث يجرى عندئذ تصحيحا مناسبا على النتيجة الحاصلة فاذا علم مثلا أن الحجوم المبينة على السحاحة تختلف قليلا عن الحجوم الحقيقية ، استطاع المحلل الكيميائى باجراء تصحيح مناسب أثناء الحساب ، أن يحصل على نتيجة قريبة من النتيجة الحقيقية ، واذا لم تؤخذ الهفوة بعين

الاعتبار كانت النتيجة محرفة وظهر الخطأ عند ئـــذ .

((اذ ن فالخطأ هو هفوة ارتكبت ولم تؤخذ بعـــين الاعتبـــــار)) .

فللحصول على نتيجة صحيحة لابد من توضيح الأثر الذى تحدثه الهفوة المعنية على النتيجة المذكورة ، وقد يختلف هـذا الأثر بالاشارة أو القيمــــة .

اشـــارة الهفــــوة :

يمكن أن تقسم جميع العمليات التى يتألف منها القيـــاس التحليلى حسب اشارة الهفوة الى ثلاثة أنـــواع :

١ – هناك عمليات تكون اشارة الهفوة عند تنفيذها موجبة دوما .

فنرى مثلا أن عملية تحول الراسب مع ورقة الترشيح الى رماد يرافقها دوما ازدياد فى كتلة الراسب ، أى تكون الهفوة عند تنفيذ هذه العملية ذات اشارة موجبة

٢ – ويحدث عكس ذلك فى عمليات أخرى حيث تكون اشـــارة الهفوة سالبة فقط . فعندما تبقى على جدران الانـــا ،

بعد الترسيب آثار من الراسب لم يتيسر نزعها كليا فا ن اشارة الهفوة عندئذ تكون سالبة فقط ·

٣ ــ وأخيرا قد تكون اشارة الهفوة فى بعض الحالات اما موجبة أو سالبة · وهذا مايحدث مثلا عند التعامل بسنجات لم يتم اختبارها حيث تكون كتلة الوزنة الناتجة أكبر أو أصغر من الكتلة الحقيقية ، فالمحلل الكيميائى فى هذه الحالـــة لايستطيع معرفة التأثير الذى تحدثه الهفوة المعنية علـــى نتيجة القياس ·

اشـــــارة الخطـــــأ :

ان اشارة الهفوة لاتعنى بالضرورة أن للخطأ المرتكب فـــى نتيجة التحليل اشارة مماثلة لها · فلتوضيح مدى تأثير الهفـــوة المعنية على نتيجة القياس لابد من مراجعة العلاقة الحسابيـــة المستخدمة فى حساب نتيجة التحليل · فمثلا عند تقدير رماد مادة عضوية نحصل على النسبة المئوية للرماد بالمعادلة التاليـــة :ــ

$$\text{نسبة الرماد \%} = \frac{\text{وزن الرماد} \times 100}{\text{وزن العينة}}$$

فالهفوة الموجبة أثناء تقدير كتلة الرماد تؤدى الى الحصول

على نتيجة أعلى من النتيجة الحقيقية فى حين أنها اذا كانت أثناء تقدير وزن العينة تؤدى الى الحصول على نتيجة أقل من النتيجة الحقيقيـــة •

المدلــول العـــددى للخـــطأ :

عندما تعرف اشارة الهفوة وقيمتها يمكن تقدير الخطـأ عدديا وبالتالى تصحيح النتيـــجة •

مثـــال :

وجد بنتيجة تعيين عيار محلول حمض الكبريتيك بواسطة وزنة منفردة مباشرة من البوراكس أن :

$T_{H_2SO_4}$ = ٠٠٤٨٢٠ر٠ علما بأنه قـد أضيفت نقطتان فائضتان من المحلول أثناء المعايـــرة •

ولقد بلغ حجم الحمض المستهلك أثناء المعايـــــرة ٢٠٠ر١٥ مل ويساوى حجم النقطة الواحدة ٠٤٠ر٠مل •

احسب القيمة الصحيحة لعيار حمض الكبريتيك •

الحـــل :

كمية الحمض الصحيحة اللازمة للمعايـــرة =

٢ر١٥ ـ (٢ x ٤٠ر) = ١٢ر١٥ مـــل

اذن قيمة العيار الصحيحة أكبر من القيمة المعينة بقدرما

لأن الحجم اللازم من الحمض أقل من الحجــــم

المستهلك أى أن :

٠٤٨٤٥ر٠ = (٢٠ر١٥ x ٠٤٨٢٠ر٠) / ١٢ر١٥

$T_{H_2SO_4}$ =

وواضح من هذا المثال أنه كلما ازداد حجم الحمـــض المستهلك على معايرة الوزنة (وبالتالى كلما ازدادت وزنـــة البوراكس) قل الخطأ فى النتيجة وذلك عند قيمة واحدة للهفـوة المرتكبة أثناء المعايرة .

معـــادلـة الأخطـــاء :

تنجم عن الخواص الحسابية للكسور نتيجة هامة جـــدا مفادها أن الأخطاء المرتكبة غالبا ماتفنى بعضها بعضـــا ولا تؤثر على النتيجة النهائية ، وتتحقق معادلة الأخطاء هـــذه عندما ترفع أو تخفض الأخطاء المذكورة عددا متساويا من المـرات قيمتى البسط والمقام فى العلاقة الحسابية الكسرية .

فنرى مثلا : عند تعيين عيـار محلول ما بطريقة المعاصة

ان ازدياد حجم المحاليل الناجم عن تغير درجة الحرارة في المعمل لن يؤثر على قيمة العيار الناتجة نظرا لأن كلا من حجم المحلول الأصلي وحجم المحلول المدروس يتغير عندئذ عددا متساويا من المرات • ولهذا فان تغير درجة الحرارة في جو المعمل لايؤثر أبدا على نتائج التحاليل التي تجرى بطريقة المعايرة •

وفي حال تعين العيار بطريقة الوزنات المنفصلة ، فان التغير المذكور في درجة حرارة المحاليل يؤدي الى نتيجة أخرى وذلك لأن معايرة وزنات متساوية من المادة الأصلية تستهلك عند درجة الحرارة المنخفضة حجما من المحلول المدروس أقل منه عند درجة الحرارة الأعلى ، اذن ستختلف هنا قيم العيار العينة عند درجات حرارة مختلفة نظرا لأن معادلة الأخطاء لن تحدث في هذه الحالة ، وعندئذ تكون كل قيمة للعيار صحيحة عند درجة الحرارة التي تم تعيينه عندها ، وهنا تظهر من جديد امكانية معادلة الأخطاء ، فلكي يتم ذلك يجب أن تتساوى درجة الحرارة التي يعين عندها العيار للمحلول القياسي مع درجات الحرارة التي ينفذ عندها التحليل بواسطة هذا المحلول •

معادلة الأخطاء أثناء قياس الحجوم :

لمعادلة الأخطاء أثناء قياس الحجوم أهمية

أهمية كبيرة فى التحليل الحجمى • ففى جميع العلاقات المستخدمة لحساب التحاليل الجارية بطريقة الماصــة توجد فى البسط والمقام قيمة كل من حجم المحلول المأخوذ بالماصة وحجم المحلول المسكوب من الســحاحة •

فاذا صادف أن الأخطاء النسبية المرتكبة فــى هذين القياسين متساوية فان هذه الأخطاء تتعادل فيما بينها ولن تؤثر عندئذ على نتيجة التحليل •

وفى حالة تطبيق طريقة الوزنات المستعملـــــة فان معادلة الأخطاء المرتكبة لدى قياس الحجوم تتم مثلا : عندما تجرى المعايرة أثناء التحليل بالترتيب نفســـه وبالسحاحة نفسها المستخدمة أثناء تعيين عيار المحلول القياسى المستخدم •

العينـــات القيــاســـية :

تعتمد طريقة تعيين عيار المحاليل القياسية بواســطة مايسمى بالعينات القياسية او عينـــــات التعبـــــير CALIBRATION SAMPLES على ظاهرة معادلة الأخطاء •

فمثلا : لنفرض أنه ترتكب أخطاء واحدة عند تكرار عملية تقديــر

الأزوت في عينة لحم جافة بطريقة كلد اهل ((ميكرو كلد اهـل)) ٠
وكما هو معلوم فان هذا التقدير ترافقه أخطاء تبقى قيمهـا وأحيانا اشاراتها مجهـولة ٠ فمن المحتمل هنا تطاير جزء من العينة عند هضمها أو حدوث هفوة في وزنها وقد يتطاير جزء من الأمونيا قبل امتصاص حمض البوريك لها ٠٠٠ الخ ٠٠٠ وهكـذا وبالنظر الى تنوع هذه الأخطاء فان المحلل لا يستطيع تقدير التأثير الاجمالي لهذه الأخطاء على نتيجة التحليل النهائيـة ٠

ولكن اذا أجريت عدة تحاليل للعينة نفسها وأعطـت جميعها نتائج متساوية (أعلى أو أقل بصورة متساوية من الكميـة الحقيقية للأزوت) أمكن القول عندئذ بأن القيمة الاجمالية لجميع الأخطاء المرتكبة أثناء تنفيذ هذه التحاليل ثابتة نظرا لأنها تؤثـر تأثيرا متساويا على النتيجة ٠ ففي هذه الحالة يسهل تقدير القيمة الاجمالية لهذه الأخطاء انطلاقا من الكمية الحقيقية للأزوت فـي العينـة ٠

لنفرض أنه حصل عند تقدير الأزوت في عينة لحم جاف علـى النتائج التاليـة :

* وزن العينـة ٣٣٥٦ر جم
* الحجم المستهلك من محلول حمض الكبريتيك القياسـي في المعـايرة ١٤٫٤٥ مـل

* عيار حمض الكبريتيك بالأزوت ٠٣١ر٠ = $T_{H_2SO_4}$

اذن نسبة الأزوت فى العينة % = $\frac{١٠٠ \times ١٤{,}٤٥ \times ٠٠٣١ر}{٣٣٥٦ر}$

= ١٣٫٣٥

لنفرض أن الكمية الحقيقية للأزوت أعلى من ذلك وتساوى ١٣٫٦٠ % فهذا الاختلاف فى القيمتين البالغ ٢٥ر% هو نتيجة أخطاء لاتعرف قيمتها من الممكن بسهولة معادلة جميع هذه الأخطاء وذلك بادخال حد فى العلاقة الحسابية يرفع نتيجة التحليل فى المثال السابق من ١٣٫٣٥ % الى ١٣٫٦٠ % ولايجاد هذا الحد يستفاد بالمعادلة التالية :

$$١٣{,}٦٠ = \frac{١٠٠ \times ١٤{,}٤٥ \times ٠٠٣١ر \times X}{٣٣٥٦ر}$$

حيث X الحد المكافئ للخطأ

ولكن هذا الحد لايحسب عادة وانما يفترض عن قيمة أخرى هى حاصل ضرب هذا الحد فى عيار المحلول أى K = X × ٠٠٣١ر ويوضع K فى العلاقة الحسابية

$$\frac{١٠٠ \times ١٤{,}٤٥ \times K}{٣٣٥٦ر}$$

نحصل على K = (٣٣٥٦ر × ١٣٫٦٠) / (١٠٠ × ١٤٫٤٥) = ٠٫٠٠٣١٥٩

والقيمة الحاصلة هي عيار محلول حمض الكبريتيك المقدر بواسطة العينة القياسية ، ومن الواضح أنه اذا أجرى حساب التحليل نفسه بالتعويض عن $T_{H_2SO_4}$ بالقيمة ٠٫٠٠٣١٥٩ حصلنا على النتيجة الصحيحة وهي ١٣٫٦ .

وبالرغم من أن قيمة العيار المحسوبة ليست صحيحة الا أنها تكافئ جميع أخطاء التحليل ولهذا فهي تعطي نتيجة صحيحة .

ولتعيين عيار المحلول القياسي بواسطة العينة القياسية تؤخذ وزنة من هذا المحلول وتحلل حسب الطريقة المعتمدة لذلك ، ثم تنظم ، بناء على المعطيات الناتجة العلاقة الحسابية ، التي يعبر فيها الحد المجهول (K) ليس عن نتيجة التحليل المعروفة من بطاقة العينة القياسية ، وانما عن عيار المحلول القياسي المقدر .

هذا ولابد من اتباع قواعد معينة عند الاستعانة بالمحاليل القياسية التي تم تعيين عيارها بواسطة العينات القياسية :

١ ــ لا تستخدم هذه المحاليل القياسية الا من أجل تحليل

العينات المشابهة للعينة القياسية التى يتعين بواسطتها عيار المحلـــول المعنى •

٢ – لايجوز أن تختلف كثيرا كمية المكون المراد تعيينه فـــى العينة المدروسة عن كميته فى العينة القياسية •

٣ – يجب ألا تختلف طريقة التقدير أثناء اجراء التحليل عــن الطريقة التى تم بموجبها تعيين المعيار بواسطة العينـــة القياســـية •

٤ – يجب أن تستخدم عند تعيين العيار وتنفيذ التحليـــل كواشف واحدة وبكميات متساوية تماما •

وقد يحدث فى حالة عدم التقيد بهذه القواعد أن تختلف قيم الأخطاء المرتكبة أثناء تعيين العيار عنها أثناء تنفيذ التحليل وعندئذ لن تتم معادلة هذه الأخطاء عند ادخال قيمة العيـــار المقدرة بواسطة العينة القياســـية •

حـــالات أخرى لمعادلة الأخطـــاء :

تتم معادلة الأخطاء فى جميع الحالات التى يستخدم فيها الفرق بين نتيجتى قياسيين ، فعلى سبيل المثال عندما تؤخـــذ

وزنة بطريقة الفرق بين وزنتين فان الأخطاء في السنجات المستخدمة في عمليتي الوزن تفنى بعضها بعضـــا .

ومن هنا تستنتج القاعدة التالية وهي :

((ان القياسات الواحدة التي نضطر أثناء التحليل الى اعادتها عدة مرات في خطوات مختلفة من التحليل الواحد يجب أن تتم بواسطة جهاز قياس واحـــد)) .

ويرتكب خطأ كبير في نتيجة القياس عند استخدام أجهزة قياس مختلفة تعطي أخطاء مختلفة الاشـــارة .

فمثلا : تجرى جميع عمليات الوزن المتضمنة في عمليـــة تحليل واحدة بما في ذلك وزن العينات المدروسة وعينات الضبط وعينات التعيير والرواسب والكواشف على نفس الميزان وبنفس علبـــة السنج وبنفس الطريقة ، وكذلك عند استخدام قياسات ضوئيـــة على جهاز SPECTROPHOTOMETER يجب أن تقاس جميـــع عينات الدراسة والضبط والتعيير على نفس الجهاز وبنفـــس الخلية CAVETTE ..... وهكـــذا .

تجربة معادلة الخطأ BLANK :

تتم أحيانا معادلة مصطنعة لبعض الأخطاء المرتكبة أثناء التحاليل وذلك عن طريق اجراء ما يسمى بالتجربة المعادلة للخطأ BLANK ويتلخص أساس هذه التجربة فيما يلي :

لنفرض أنه عند تقدير الأزوت بطريقة كلداهل مثلا أن الكواشف المستخدمة في هذا التحليل مثل ((حمض الكبريتيك المركز — ومخلوط الهضم — والصودا الكاوية ، وحمض البوريك)) تحوى قدرا ما من الأزوت ، ولهذا نحصل على نتيجة أعلى من القيمة الحقيقية .

وعند ما لا تتوفر في المعمل الكواشف النقية جدا فانه تجرى عندئذ تجربة معادلة الخطأ BLANK وهى تجربة تجرى في نفس الظروف التى تجرى فيها التجربة المبحوثة ويتثنى من ذلك أنها خالية من المادة المدروسة . ويشرط أن تستخدم في جميع مراحلها الكواشف المستخدمة أثناء التحليل ويجب أن تكون كميات الكواشف المستهلكة في هذه التجربة مماثلة تماما للكميات المستهلكة في التحليل الأساسي ، وبما أن هذه الكواشف تحوى كمية ما من الأزوت لذا فسوف تخرج كمية ما من الأمونيا من جهاز

التقطير تنتهي في حمض البوريك وتعاير بنفس الحمض المستخدم في المعايرة ، فبهذه الطريقة تعادل الخطأ الناجم عن كون الكواشف المستخدمة ليست نقية الى حد كاف .

وقد تزاد كمية الكواشف عدة مرات عندما نحصل في تجربة (البلانك) على كمية قليلة جدا من الأمونيا . وتخفض القيمة المطروحة من التجربة الأساسية بعدد مماثل من المرات .

تصنيف الأخطاء :

بالرغم من أن قسما من الأخطاء المرتكبة أثناء التحليل يتعادل اما أتوماتيكيا أو بطريقة من الطرائق المذكورة سابقا الا أن القسم الآخر منها يبقى دون تعادل ، وبالتالي يؤثر على نتيجة التحليل وعندئذ لن تكشف الأخطاء المرتكبة ، وتؤخذ النتائج الحاصلة على أنها نتائج صحيحة . وللكشف عن الأخطاء المرتكبة لابد من التعرف على الأسباب المؤدية الى حدوث الأخطاء الشائعة والاطلاع على تصنيف هذه الأخطاء .

وبناء على نظرية الأخطاء ، تنسب جميع الأخطاء المحتمل حدوثها أثناء القياسات الى ثلاثة أنواع :

١ ـ الأخطاء الفادحة :

مثال ذلك الأخطاء المرتكبة أثناء الحسابات وكتابة الأرقام واستخدام أواني الغير عفويا .

ويسهل عادة اكتشاف الأخطاء الفادحة نظرا لأنها تحرف نتائج التحليل الحاصلة عن النتائج المتوقعة انحرافا حادا يتعدى أحيانا ١٠٠ ٪ ، وتكرار التحليل يساعد على اكتشافها ومن ثم تفادى الأخطاء الفادحة .

٢ ـ الأخطاء الدورية :

وهى أخطاء تتكرر أثناء تنفيذ عدة تحاليل متوازيه ، وتنجم هذه الأخطاء ، قبل كل شيء عن استخدام أجهزة قياس غير دقيقة (كأن تستخدم سنجات غير قياسية أو أوزان حجمية ذات تدريج خاطئ) واستعمال كاشف ملوث بالمادة المدروسة .

وينسب الى هذه الأخطاء مايسمى بالاخطاء

الذاتية للمحلل ((الأخطاء الشخصيـــة HUMAN ERRORS)) وهى نتيجـــة للخصائص الفردية للمحلل المعنى ، فالمحـــلل الضعيف البصر مثلا يستهلك عادة فى المعايـــرة حجما أكبر دوما من الحجم اللازم ، فاذا لــــم يعادل هذا الخطأ كانت النتيجة الحاصلة أعلى أو أقل من القيمة الحقيقيـــة ٠

وتجدر الاشارة الى أن الأخطاء الدوريـــة لاتسبب غالبا انحرافات كبيرة فى نتائج التحاليـل المتوازية ، وهذا مايدفع بالمحلل غير المطلع على نظرية الأخطاء الى الاعتقاد بأن هذا التطابـــق فى النتائج هو برهان قاطع على صحة التحاليـل المنفذة ٠

هذا وتكتشف الأخطاء الدورية باجـــــراء التحليل فى ظروف تختلف تماما عن الظــــروف الأولى وفى أجهزة قياس أخرى وبواسطة كواشـــف أخرى أيضا ٠ كما يفضل أن يعاد التحليل فـــى معمل آخـــــر ٠

٣ ـ الأخطاء العرضية :

تظهر أخطاء هذا النوع صدفة ، وقد لا تتكرر عند اعادة التحليل عدة مرات أو قد تأخذ قيما مختلفة وأحيانا اشارات مختلفة أيضا .

فمثلا قد يحدث أثناء تحميص الراسب في فرن احتراق أن يسقط في احدى البواتق جسم ما من المادة المقاومة للحرارة مما يؤدى الى حدوث خطأ صغير لا يتكرر . ومن المحتمل دوما أثناء تثبيت مستوى المحلول في السحاحة عند تدريجة الصفر أن يحدث خطأ ما يختلف في عدد من القياسات بالقيمة والاشارة أيضا ، وذلك لأن المحلل قد يثبت مستوى المحلول في احدى القياسات عند نقطة أعلى بقليل من تدريجة الصفر وفي قياسات أخرى عند نقطة أخفض بقليل من تدريجة الصفر .

ومن الممكن اضعاف تأثير الأخطاء العرضية على النتيجة النهائية لعدد من القياسات المتوازية وذلك عن طريق معالجة النتائج الحاصلة

بطرائق الاحصاء الرياضي ولا تعالج بهذه الطرائق سوى نتائج عدد من التحاليل المتوازية التي تستثنى منها الأخطاء الفادحة والدورية .

معالجة نتائج عدد من القياسات :

كما أشرنا في بداية هذا الباب ، فانه من المحتم أثناء تنفيذ جميع العمليات التحليلية وما يرافقها من قياسات مختلفة أن ترتكب بعض الأخطاء التي لا تتعوض ولهذا تكون نتيجة التحليل النهائية ليست معفاة من الخطأ .

وعندما يجري المحلل الكيميائي عدة تحاليل لعينة واحدة فانه يحصل على عدة نتائج تختلف عن بعضها البعض وهذا ما يسمى بمدى تباعد النتائج أو عدم الضبط IMPRECISION

ويدل الفرق بين النتيجتين العظمى والصغرى على عنصر الضبط كأحد عناصر الثقة في النتيجة كما أشرنا في الفصل الأول من هذا الباب . ولما كان اجراء التحليل على عدد كبير من المكررات لكل عينة مبحوثة أمرا شاقا ومكلفا ، لذلك تجرى هذه المعالجة للخطأ على العينة الضابطة ويستدل منها على مدى الثقة في النتائج الأخرى للعينات المبحوثة ويقدر مقدار الخطأ أو الانحراف

لبذكر مع القيم المقدرة اذا كان معقولا أو ترفض طريقة التحليل نهائيا اذا كانت قيمة الخطأ المقدرة كبيرة .

ولا يتحقق هذا الأمر الا بالاعتماد على النظرية الرياضية للأخطاء التى يجب أن يلم كل محلل كيميائى بمبادئها الأساسية . ولهذا سنتعرف على مثال ملموس ، ودون الغوص فى المحاكمات النظرية المعقدة ، على الطرائق التى تسمح فى نهاية الأمر بتقدير الخطأ الأكثر احتمالا فى النتيجة النهائية .

المثال :

فى تجربة لبيان تأثير معاملتين غذائيتين على بروتين مصل الدم فى الدجاج أجرى تقدير للبروتين فى مصل الدم على فترات زمنية مختلفة من عمر الطائر وأجرى الاختبار بطريقة القياسات الضوئية الطيفية SPECTROPHOTOMETERY بقياس لون تفاعل NINHYDRIN مع البروتين ، وبدون ذكر تفاصيل اجراءات طريقة التقدير نوجز الخطوات الرئيسية فيمايلى :

١ – حضرت العينات بفصل كرات الدم عن المصل بالطرد المركزى .

٢ – عند اضافة حجم ثابت من محلول NINHYDRIN

المذاب فى الأسيتون يتكون لون أزرق بنفسجى نتيجة اتحاد NINHYDRIN مع الاحماض الأمينية والروابط الببتيدية يقاس هذا اللون على جهاز SPECTROPHOTOMETER عند طول موجى ٤٤٠ نانومتر ٠

٣ ـ أخذت عينة دم من طائر ـ أو عدة طيور وتخلط ـ أختير أو اختيرت عشوائيا من طيور المعاملتين قسمت الى خمسة عينات SAMPLES نرمز لها بالرمز "ط" وتأخذ رقم يدل على الفترة العمرية كما يلى ط ١٠ ، ط ٢٠ ، ط ٣٠ ، ط ٤٠ ، ط ٥٠ وذلك حسب الفترات الزمنية المختلفة التى سوف يعاد فيها التحليل وتسمى هذه العينات بالعينات الضابطة CONTROL SAMPLES

٤ ـ فى الفترة العمرية الأولى (١٥ / ١٠) أختير عشرة طيور عشوائيا من كل معامل وأخذت منها عينات دم فصل مصلها وقدر بروتينها مع العينة ط١٠ وتم ذلك مرة أخرى وبنفس الطريقة فى الفترة العمرية الثانية التى أجريت فى ٣٠ / ١٠ مع العينة ط٢٠

وهكذا فى ١١/١٥ مع ط.٣ ، ١١/٣٠ مع ط.٤ ، ١٢/١٥ مع ط.٥ .

٥ - واذا رمزنا لكل عينة من عينات المعاملات برمز (م) ورقم ثلاثى المئات يشير الى رقم المعاملة والعشرات الى الفترة العمرية والآحاد الى رقم الطائر تكون العينة التى أخذت من الطائر الأول فى الفترة العمرية الأولى من المعاملة الأولى م ١١١ وكذلك عينة الطائر الرابع فى الفترة العمرية الثالثة من المعاملة الثانية م ٢٣٤ .

٦ - استخدم فى التحليل محلولان قياسيان الأول يحتوى على ٥ جرام بروتين لكل ١٠٠ مل ويمثل المحلول القياسى للتعبير CALSBRATION SOLUTION وهو يقدر من ضمن العينات فى جميع فترات التحصيل ونرمز له بالرمز (ع) وعند كل فترة عمرية نعطى له أرقام ع ١٠ ، ع ٢٠ ، ع ٣٠ ، ع ٤٠ ، ع ٥٠ .

والمحلول الآخر خلو تماما من البروتين ويحتوى على جميع مكونات المحلول السابق فيما عدا البروتين ، ويضاف اليها NINHYDRIN

وذلك لقياس لون المادة الملونة مع المحـــوى

(MATRIX) ويرمز له بالرمـــــز (ح)

ويأخذ أرقام الفترات العمرية ح ١٠، ح ٢٠

ح ٣٠، ح ٤٠، ح ٥٠، ح

٧ _ قسمت كل عينة من عينات المحلول القياســـى

والمحلول الخالى من البروتين والعينات الخاصة

بالمعاملات كل منها الى عينتين SPECIMENS

أحدهما يضاف اليها الـ NINLYDRIN

المذاب فى الأسيتون والأخرى لا يضاف اليهـــا

الا الأسيتون فقط وتسمى عينات معادلة الخطـــأ

(BLANK) ويرمز لها بالرمـــز (ب)

مع رمز العينة كما يلى ع ب، ح ب، ط ب

م ب .

٨ _ عند اجراء القياس على جهاز SPECTROPHOTOMETER

توضع عينة معادلة الخطأ أولا مع كل نوع من أنواع

العينات ويضبط صفر التدريج معها وبذلك يلغى

تأثير المحوى قبل القياس ثم تقاس العينـــــة

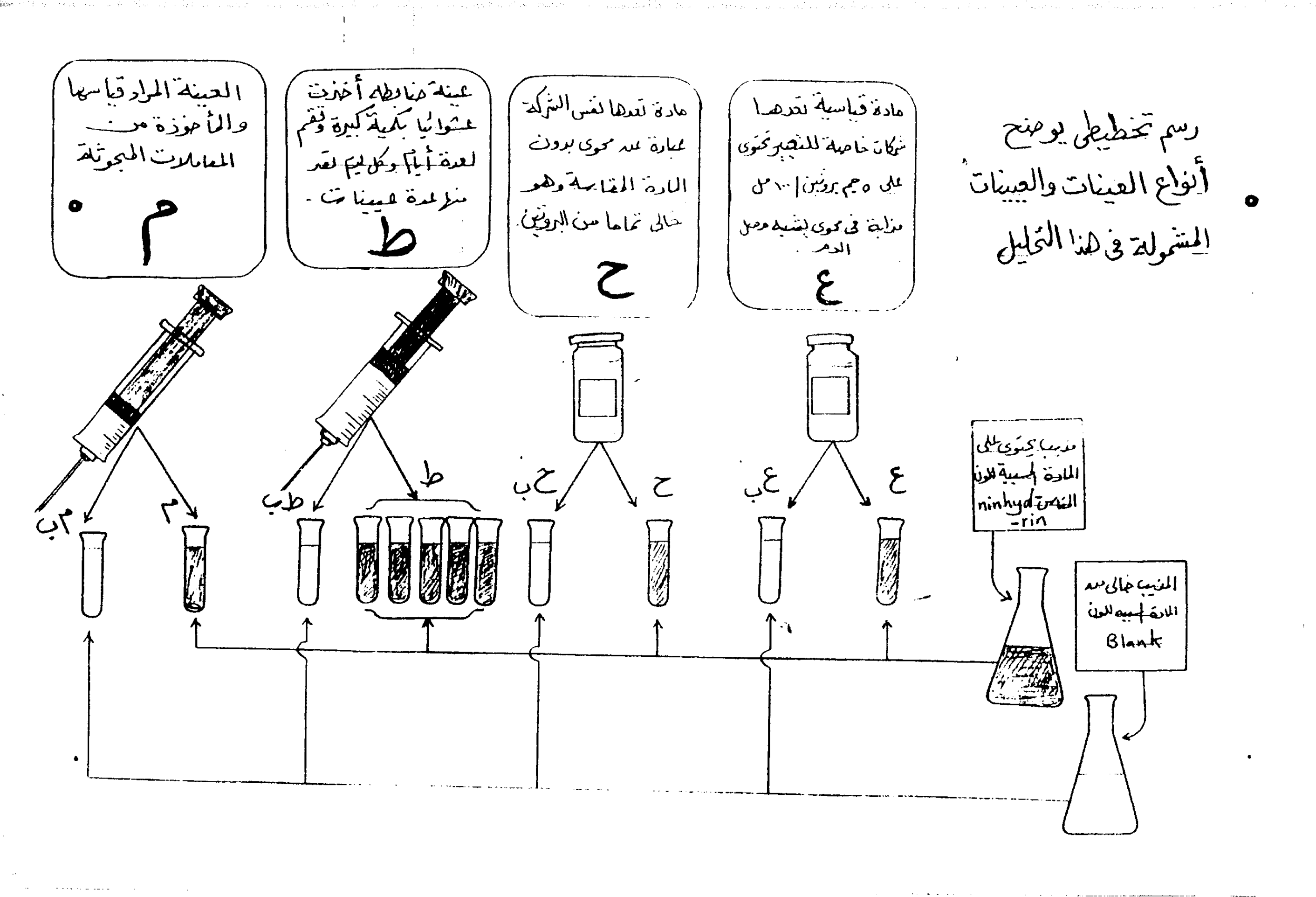
المحتوية على NINLYDRIN وتسجل

قراءتها .

وبالتالى يمكن حصر أنواع العينات المشمولة فى

هذا التحليل فى الرسم التخطيطى التالى

والجدول الذى يليه .



رسم تخطيطي يوضح أنواع العينات والعينات المشمولة في هذا التحليل
العينة المراد قياسها والمأخوذة من المعاملات المبحوثة
م
عينة ضابطة أخذت عشوائيا بكمية كبيرة تقسم لعدة أيام وكل يوم تقدر مع عدة عينات .
ط
مادة تعدها نفس الشركة عبارة عن محوى بدون المادة الفعالة وهو خالي تماما من البروتين
ح
مادة قياسية تعدها شركات خاصة للتجهيز تحوى على ٥ جم بروتين / ١٠٠ مل مذابة في محوى يشبه وصل الدم .
ع
م ب
م
ط ب
ط
ح ب
ح
ع ب
ع
مذيب يحتوي على المادة المسببة للون ninhydrin
المذيب خالي من المادة المسببة للون Blank

رمز العينة	اسم العينة	وصف مدلولها	الهدف منها
ع	عينة تعيير	تؤخذ من المادة القياسية المحددة بدقة عالية وتحتوى على كمية معلومة من المادة المقاسة •	تعيير قراءات الجهاز بالتركيز
ح	عينة معادلة أخطاء المحتوى	تؤخذ من المحلول المعد لذلك وهو يشبه المحلول السابق وينتج معه من نفس الشركة التجارية ولكنه خالى تماما من المادة المقاسة •	للتخلص من الخطأ الناشئ عن تأثير المحوى على التفاعل وتطور اللون المقاس •
ط	عينة ضابطة	تؤخذ من طائر واحد أو عدة طيور عشوائية وتخلط وتقسم الى عينات بعدد أيام التحليل •	لضبط واحكام طريقة التحليل وتقدير درجة الثقة في النتيجة •
م	عينة المعاملة المختبرة	عينة من الطائر المختار من المعاملة للقياس المطلوب ((وهى العينة المعنية بالتجربة))	لتقدير المادة المقاسة في عينات البحث المطلوبة •
ع ب	عينة معادلة الخطأ بسبب التفاعل المسبب للون في عينة التعيير •	عينة من عينات التعيير لا يضاف اليها المادة المكونة للون •	تستخدم لمعادلة الأخطاء المتسببة عن قياس الجهاز للون والمادة المتفاعلة وتأثير المحوى على الامتصاص الضوئى في الجهاز وبواسطتها يضبط الجهاز على صفر التدريج •
ح ب	عينة معادلة الخطأ بسبب التفاعل في عينة المحتوى •	عينة من عينات التعيير الخالية من المادة المدروسة ومن المادة الملونة	
ط ب	عينة معادلة الخطأ في العينة الضابطة •	عينة من عينات الضبط خالية من المادة الملونة •	
م ب	عينة معادلة الخطأ في عينات المعاملات •	عينة من عينات المعاملات خالية من المادة الملونة •	

معالجة نتائج العينات :

عند معالجة النتائج والاستفادة من أنواع العينات السابق شرحها يتلاحظ لنا أن قراءات العينات الأربع الأخيرة من الجدول السابق والمرموز لها بالرمز (ب) تطرح من قراءات العينة المقابلة لها ((أى العينة الأخرى التى أضيف اليها المادة الملونة))

أى أن ع ب يطرح من ع لتعطى قيمة ع المصححة لتأثير المحلول على امتصاص الضوء

وكذلك ح ب تطرح من ح " " ح " " " " " " " "

{ ط ب " " ط " " ط " " " " " " " "

{ م ب " " م " " م " " " " " " " "

ومن الناحية العملية لا يحدث هذا الطرح حسابيا ولكن يضبط صفر التدريج لجهاز القياس الضوئى مع وجود محلول هذه العينات بمعنى أنه عند قياس العينة ع ١٠ مثلا توضع فى الجهاز العينة ع ب ١٠ فيعطى الجهاز قراءة ((وهى قراءة صغيرة)) يحرك مفتاح الضبط فى الجهاز لالغاء أثر امتصاص هذه العينة للضوء حتى يقف مؤشر القراءة على الصفر ويثبت ومعنى ذلك أنه قد حدث طرح فعلى لقراءة هذه العينة على الجهاز ثم ترفع وتوضع عينة القياس ع ١٠ وتسجل قراءتها المضبوطة ..... وهكذا

معايرة العينـــــات .

أما معالجة القراءات المضبوطة المتحصل عليها بعد ذلك فتصحح من خطأ تأثير المحتوى على التفاعل وذلك بطرح قيمة قـــراءة (ح) المضبوطه والتى تساوى فى الحقيقة (ح – ح ب) من كل القراءات للعينات الأخرى ع ، ط ، م .

يحسب معامل التعيير (عت) باستخدام قراءات عينـــات ع (ق ع) المصححة كالآتـــــى :

$$\text{عت} = \frac{\text{تركيز المادة المقاســة فى عينــة التعيـــير}}{\text{قراءة الجهاز لعينة التعيير المضبوطة المصححة}}$$

اذ بمعنى آخر

$$\text{عت} = \frac{\text{ت}}{(\text{ق ع} - \text{ق ع}_{\text{ب}}) - (\text{ق ح} - \text{ق ح}_{\text{ب}})}$$

حيث : ت هى تركيز المادة المقاسة فى عينة التعيير

ق ع : قراءة الجهاز من العينة ع القياسية وبها المادة الملونة

$\text{ق ع}_{\text{ب}}$: " " " " $\text{ع}_{\text{ب}}$ " بدون " "

ق ح : " " " " ح الخالية من المادة القياسة وبها المادة الملونة .

ق ح ب : " " " " ح ب الخالية من المادة المقاسة والخالية ايضـا من المادة الملونـــة

عت : معامل التعيـــير

يقدر تركيز البروتين فى العينات ط ، م بضرب

القراءة المصححة لمككررات كل منها

والتى تساوى :

(ط ــ ح) ÷ (م ــ ح) فى

معامل التعبير المحسوب .

اى أن :

نسبة البروتين فى العينة ط١١ =

(ق ط١١ ــ قح ١٠) × عت ١٠

وكذلك :

نسبة البروتين فى العينة م٢٣٥ =

(قم٢٣٥ ــ ق ح ٣٠) × عت ٣٠

والجدول التالى يوضح قراءات

الجهاز التى سجلت من التجربة المشروحة

فى هذا المثال :

جدول تسجيل قراءات جهاز القياس الضوئي لعينات المثال السابق :

نوع العينات	الفترة الأولى ١٠/١٥		الفترة الثانية ١٠/٣٠		الفترة الثالثة ١١/١٥		الفترة الرابعة ١١/٣٠		الفترة الخامسة ١٢/١٥	
	العينة	القراءة	العينة	القراءة	العينة	القراءة	العينة	القراءة	العينة	القراءة
عينات بمادلة الخطأ ح BLANK	ح ١٠	ر٤٢	ح ٢٥	ر٣٢	ح ٣٠	ر٤٥	ح ٤٠	ر١١	ح ٥٠	ر٤٦
عينات التعيير ع QLIBRATION SAM PLE	ع ١٠	٣٠ر٨١	ع ٢٠	٣٠ر٧٢	ع ٣٠	٣٠ر٨٠	ع ٤٠	٣١ر٠١	ع ٥٠	٣٠ر٨٥
عينات الضبط ط CONTROL SAM PLE	ط ١٠	٤٢ر٠٨	ط ٢٠	٤٢ر٨٠	ط ٣٠	٤٢ر٠٠	ط ٤٠	٤٢ر١٥	ط ٥٠	٤٤ر٠١
	ط ١١	٤٢ر٧٥	ط ٢١	٤٢ر٩١	ط ٣١	٤٣ر٠٨	ط ٤١	٤٢ر٦٨	ط ٥١	٤٣ر٨٦
	ط ١٢	٤٢ر٦٠	ط ٢٢	٤٣ر٠١	ط ٣٢	٤٢ر٩٦	ط ٤٢	٤١ر٦٠	ط ٥٢	٤٣ر٨١
	ط ١٣	٤٢ر٧٦	ط ٢٣	٤٢ر٧٥	ط ٣٣	٤٣ر١٢	ط ٤٣	٤٣ر٢٠	ط ٥٣	٤٣ر٤٠
	ط ١٤	٤٢ر٤١	ط ٢٤	٤٣ر٠٢	ط ٣٤	٤٣ر٠٦	ط ٤٤	٤٤ر٣٨	ط ٥٤	٤٣ر٩٦
عينات المعاملة م ١٠٠ الأولى	م ١١٠	٤٥ر١٨	م ١٢٠	٤٦ر٠٨	م ١٣٠	٥٠ر١٢	م ١٤٠	٥٠ر٠٠	م ١٥٠	٤٨ر١٨
	م ١١١	٤٥ر٢٠	م ١٢١	٤٥ر٣٥	م ١٣١	٤٨ر١٨	م ١٤١	٥١ر٠٨	م ١٥١	٤٥ر٣٦
	م ١١٢	٤٥ر٣٦	م ١٢٢	٤٧ر١٣	م ١٣٢	٤٩ر١٨	م ١٤٢	٤٦ر٠٣	م ١٥٢	٤٣ر٠٨
	م ١١٣	٤٥ر٠٨	م ١٢٣	٤٦ر٧٠	م ١٣٣	٥٠ر٠٠	م ١٤٣	٤٤ر٠٤	م ١٥٣	٥٣ر٠٢
	م ١١٤	٤٥ر٧٠	م ١٢٤	٤٥ر٩٨	م ١٣٤	٥٠ر٣٠	م ١٤٤	٤٧ر١٨	م ١٥٤	٥٠ر٧٨
	م ١١٥	٤٤ر٩٦	م ١٢٥	٤٦ر٠٠	م ١٣٥	٥٠ر٣٦	م ١٤٥	٤٨ر٦٠	م ١٥٥	٥٢ر١٢
	م ١١٦	٤٥ر١٤	م ١٢٦	٤٧ر٠٩	م ١٣٦	٤٨ر٩٨	م ١٤٦	٤٥ر٨٢	م ١٥٦	٥٢ر٠٠
	م ١١٧	٤٤ر٨٠	م ١٢٧	٤٦ر٠١	م ١٣٧	٤٧ر٠٠	م ١٤٧	٥٢ر٣٤	م ١٥٧	٤٤ر٨٩
	م ١١٨	٤٤ر٩٥	م ١٢٨	٤٤ر٨٨	م ١٣٨	٤٩ر١٠	م ١٤٨	٥٢ر٨٠	م ١٥٨	٤٨ر٣٠
	م ١١٩	٤٤ر٩٥	م ١٢٩	٤٥ر٩٢	م ١٣٩	٥٠ر١٠	م ١٤٩	٤٦ر٨٩	م ١٥٩	٤٥ر٣٦
عينات المعاملة م ٢٠٠ الثانية	م ٢١٠	٤١ر٠٨	م ٢٢٠	٤٢ر٠٠	م ٢٣٠	٤٥ر٨٠	م ٢٤٠	٥١ر٢٢	م ٢٥٠	٤٣ر٨٦
	م ٢١١	٤١ر٠٠	م ٢٢١	٤٢ر١٠	م ٢٣١	٤٤ر٣٠	م ٢٤١	٤٦ر٣٤	م ٢٥١	٤٥ر٧٦
	م ٢١٢	٤٣ر٦٠	م ٢٢٢	٤٣ر٠٨	م ٢٣٢	٤٤ر٠٠	م ٢٤٢	٤٨ر٨٦	م ٢٥٢	٤٢ر٣٠
	م ٢١٣	٤٣ر١٠	م ٢٢٣	٤٣ر٠٠	م ٢٣٣	٤٥ر٢٤	م ٢٤٣	٥٠ر٣٠	م ٢٥٣	٤٢ر٣٠
	م ٢١٤	٤٢ر٨٤	م ٢٢٤	٤١ر٩٨	م ٢٣٤	٤٣ر٨٦	م ٢٤٤	٥٢ر١٨	م ٢٥٤	٤٦ر٤٦
	م ٢١٥	٤٢ر٦٠	م ٢٢٥	٤٤ر٥٠	م ٢٣٥	٤٤ر١٠	م ٢٤٥	٤٤ر٤٤	م ٢٥٥	٤٢ر٨٠
	م ٢١٦	٤١ر٩٠	م ٢٢٦	٤٣ر٩٨	م ٢٣٦	٤٥ر٠٨	م ٢٤٦	٤٣ر٩٨	م ٢٥٦	٤٤ر٤٦
	م ٢١٧	٤١ر٧٦	م ٢٢٧	٤٢ر٨٠	م ٢٣٧	٤٤ر٦٠	م ٢٤٧	٥٣ر١٥	م ٢٥٧	٤٣ر٨٦
	م ٢١٨	٤٣ر٠٠	م ٢٢٨	٤٤ر١٠	م ٢٣٨	٤٤ر٨٠	م ٢٤٨	٤٦ر٢٠	م ٢٥٨	٤٤ر١٠
	م ٢١٩	٣٩ر١٠	م ٢٢٩	٤٥ر٠٠	م ٢٣٩	٤٢ر٣٠	م ٢٤٩	٤٥ر١٠	م ٢٥٩	٤٣ر٩٨

والمطلوب من هذا المثال بعد تعرفنا على أنـــواع

العينات التى شملها مايلـــــــى :

١ ـ تقدير معامل التعبير (عت) عند فترات التحليل المختلفـــــــة ٠

٢ ـ تحديد ضبط واحكام طريقة التحليل ودرجة الثقـــة فى نتائج التجربة وحجم الخطأ القياسى وتقسيمة تبعـــا لأيام التحليل ((سواء بين الأيام أو داخل اليـوم الواحـــد)) والتعليـق عليـــه ٠

٣ ـ تقديـــر نسب البروتين فى عينات البحـث فـــــى المعاملتين الغذائيتـــين ٠

<u>حــل المثـــال :</u>

١ ـ <u>تقدير معامل التعبـير (عــت) :</u>

$$\text{عت}_{\text{١٠}} = \frac{\text{ت}}{(\text{قع}_{\text{١٠}} - \text{قعب}_{\text{١٠}}) - (\text{قح}_{\text{١٠}} - \text{قحب}_{\text{١٠}})}$$

$$= \frac{\text{٥}}{\text{٣٠ر٨١} - \text{٤٢ر}} = \text{١٦٤٥٢٧٨ر٠ جم/ ١٠٠مل}$$

عت٢٠ = ٥ / (٧٢ر٣٠ ــ ٣٢ر) = ١٦٤٤٧٣٦ر جم/ ١٠٠مل

عت٣٠ = ٥ / (٨٠ر٣٠ــ ٤٥ر) = ١٦٤٧٤٤٦ر جم/ ١٠٠مل

عت٤٠ = ٥ / (٠١ر٣١ــ ٦١ر) = ١٦٤٤٧٣٦ر جم/ ١٠٠مل

عت٥٠ = ٥ / (٨٥ر٣٠ــ ٤٦ر) = ١٦٤٥٢٧٨ر جم/ ١٠٠مل

٢ ــ الضـــــبط :

يقدر نسبة البروتين فى العينات :

ط١٠ ، ط١١ ، ط١٤

وهكذا بقية عينات الضبط فى الفترات المختلفة

وذلك بضـــرب القـــراءة فـــى (عـــت)

ونتـــائج ذلك مسجلة بالجـــــــدول

التـــــالـــى :ــ

الفترات العمرية	الأولى ١٠/١٥	الثانية ١٠/٣٠	الثالثة ١١/١٥	الرابعة ١١/٣٠	الخامسة ١٢/١٥
العينات الضابطة	٦ر٩٤	٦ر٩٩	٧ر٠١	٦ر٨٣	٧ر١٧
	٦ر٩٦	٧ر٠٠	٧ر٠٢	٦ر٩٢	٧ر١٤
	٦ر٩٦	٧ر٠٢	٧ر٠٠	٦ر٧٤	٧ر١٣
	٦ر٩٧	٦ر٩٨	٧ر٠٣	٧ر٠٠	٧ر٠٦
	٦ر٩١	٧ر٠٢	٧ر٠٤	٧ر١٠	٧ر١٦
المتوسط داخل اليوم	٦ر٩٥	٧ر٠٠	٧ر٠٢	٦ر٩٤	٧ر١٣
المتوسط العام	٧ر٠١				

من المعالجة الاحصائية للبيانات المتحصل عليها من الجدول السابق يتضح أن قيمة الخطأ القياسي ومعامل الاختلاف داخل تحليلات كل يوم من أيام التحليل وبين أيام التحليل بعضها وبعض عموما يمكن تسجيلها في الجدول التالي :

القيـاس الاحصائى	الخطأ القياسى S E	معاملا الاختلاف C . V
فى الفترة الأولـى ١٠/١٥	١٠ر٠	١٥ر ٪
فى الفترة الثانيـة ١٠/٣٠	١٠ر٠	١٢ر ٪
فى الفترة الثالثـة ١١/١٥	١٠ر٠	٠٨ر ٪
فى الفترة الرابعـة ١١/٣٠	١٠ر٠	٪١٫٤٧
فى الفترة الخامسـة ١٢/١٥	٢٠ر٠	٢٧ر ٪
بـين الأيـام	٠٥ر٠	٦٩ر ٪
بين التحليلات جميعها	٠٤ر٠	٥٢ر ٪

يتضح من هذا الجدول التحليلات التى أجريت طـوال هذه التجربة لم تكن مضبوطة بالدرجة المثالية حيث زاد معامل الاختلاف لنتائج التحليل بصفة عامة عن الحد المسموح بـه وقدره ٢٥ر٪ اذ بلغ ٥٢ر٪ وهنـا يـبرز سـؤال

هل يرجع ذلك الى غيب في الباحث لعدم تمكنه من اتمام العمـــل بالطريقة ؟ أم لأن هناك أسباب أخرى أثرت على دقة العمل ولـــم يستطـع الباحث التنبه اليها أو أنه لم يستطـع التغلب عليهـا ؟

فلو كان معامل الاختلاف بين التحليلات التي تجرى في يوم واحد في جميع الفترات أقل من ٢٥ر٪ دل ذلك على الباحث المتمكن من طريقـة التحليل متقنا لها ، ولكن هناك ظروف تطرىء عليه تغيير من نتيجـــة التحليل مع تخزين العينة الضابطة ولكن لو زاد معامل الاختلاف عـــن هذا الحد داخل اليوم الواحد في جميع الأيام دل ذلك على أن الباحـث غير متقن للطريقة أو أن طريقة التحليل ليست محكمة ، ولكن لو قل معامل الاختلاف في بعض الأيام وزاد في الأخرى كما هو الحال في هذه التجربة اذ أن معامل الاختلاف في الفترات الثلاث الأولى أقل من ٢٥ر٪ ولكنـه في الفترة الرابعـة كان عاليا ١٤٧ر١ ٪ وكان في الفترة الخامسة أعلى مـــن الحد المسموح به بقليل ، وهذا يدل على أن الباحث متقن للطريقـــة وأن الطريقة مكنة الانضباط ، الا أن التحليل تعرض في بعض الأيـــام لأسباب قد تكون شخصية اذ نجدها أثرت بطريقة غير نسقية على انضبـــاط التحليـــــــل .

وفيما يتعلق بمعامل الاختلاف بين الأيام يتلاحظ أن مجـــرد وجود العينة الضابطة وتخزينها لفترات التحليل أثر ذلك في نتيجـــة

التحليل حيث وجدت فروق واضحة أثرت على معامل الاختلاف فوصل الى ٦٩ر ٪ بين هذه الأيام ، كما لوحظ أن متوسط التحليل داخل اليوم الواحد يزداد تدريجيا مع زيادة التخزين (زيادة فترة بقاء العينة لحين التحليل) وهذه الزيادة كانت مطردة فيما عدا متوسط الفترة الرابعة حيث اختلت فيها نتائج التحليل عموما ووصل معامل الاختلاف فيها الى ١٫٤٧ ٪ .

وتعتبر درجة الثقة في هذه النتائج متوسطة بصفة عامة ، ومثالية في الأيام الأولى ، ولهذا يفضل تسجيل الخطأ القياسي بجوار المتوسط باشارة (±) وعموما تعتبر الثقة في التحليل في الفترة الرابعة غير متوفرة ويفضل استبعاد نتيجتها ، كما أن نتائج الأيام الباقية والنتيجة المتحصل عليها فيها تحظى بثقة كاملة .

٣ ـ تقدير نسب البروتين في عينات البحث :

تقدر نسبة البروتين : أولا تطرح القراءة المسجلة لعينة معادلة الخطأ ح من قيم القراءة المسجلة لعينات كل معاملة .

ثانيا : نضرب القيمة بعد الطرح × معامل التعبير للفترة التي أجريت فيها

ثالثا : تحلل احصائيا لمعرفة معنوية الفروق بـــين المعاملات عند الفترات المختلفة ، ومعنويـــة الفروق بين الفترات للمعاملة الواحدة والأثـــر المتبادل بين كل من المعاملات والفــــترات العمرية ٠٠٠٠٠ الخ

وعليه تكون نسبة البروتين فى العينة م١١٧

= (ق م١١٧ – ق ح١٠) × عت١٠

= (٤٤٫٨٠ – ٤٢) × ٠٫١٦٤٥٢٧٨

= ٧٫٣٠ جم/ ١٠٠ مل

ونسبة البروتين فى العينـــــة م٢٤٢

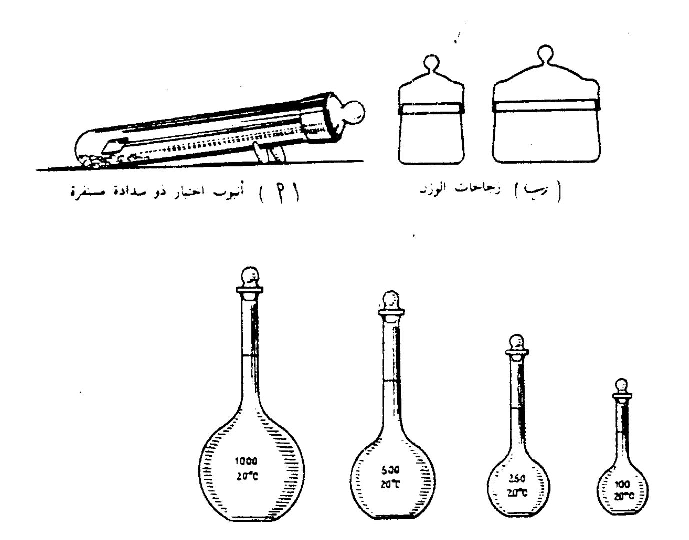
= (ق م٢٤٢ – ق ح ٤٠) × عت ٤٠

= (٤٨٫٨٦ – ٦١ر) × ٠٫١٦٤٤٧٣٦

= ٧٫٩٤ / جم/ ١٠٠ مل

وهكــــــذا ٠

الباب الثاني



(أ) أنبوب اختبار ذو سدادة مسنفرة

(ب) زجاجات الوزن

تجهيز واعداد العينة للتحليل

مقدمة

يتعلق موضوع التحليلات البيولوجية بالعينات المأخوذة من مواد حيوية تتلخص فيما يلـــــــى :

١ ـ الأغذية والاعلاف : مثل (الذرة ـ ردة القمح ـ التفاح ـ الخبز ـ السبلاج ٠٠٠٠ الخ)

٢ ـ الأنســـجة : مثل (الكبد ـ الغدد ـ الدم ـ الجلد ٠٠٠٠ الخ)

٣ ـ السوائل الحيوية : مثل (السيرم " العصـــل ـ البلازما ـ السائل الشوكى ـ السائل المنوى ٠٠٠ الخ)

٤ ـ المنتجات الحيوية : مثل (اللبن ـ البيـض ـ

الصوف ـ اللحم ٠٠٠٠ الخ)

٥ ـ الافرازات الاخراجية : مثل (البول ـ البراز ـ الدموع ـ العرق ـ المخاط ـ ٠٠٠٠٠ الخ)

٦ ـ الافرازات الداخلية : مثل (عصارة المعدة ـ الصفراء ـ عصارة البنكرياس ـ اللعاب ٠٠٠٠٠٠ الخ)

وذلك بغرض تقدير أحد أو بعض أو كل المكونات التى تشتمل عليها ، وتتلخص هذه المكونات في المجموعات التالية :

أولا : البروتينات والمواد الأزوتية .

PROTEINOUS (NITROGENOUS)

وهـــــــــي :

١ ـ مجزئات البروتينات

PROTEINS FRACTIONS

٢ ـ البروتين الكلى TOTAL PROTEIN

٣ ـ المركبات الوسيطة من نواتج الهضم والتحليل مثـــل :

الميتابروتينات ـ البروتوزات ـ البيتونات ـ البيتيدات العديدة ـ البيتيدات الثلاثية والثنائية ..... الخ

٤ ـ الأحماض الأمينيـــة

٥ ـ المواد الوسيطة للتمثيل الغذائي للأحماض الأمينيـــة .

٦ ـ نواتج التمثيل الغذائي مثـل :

اليوريا ، الكرياتين ، الكرياتينين ، حمض البوليك .... الخ

٧ ـ الأحماض النووية مثل :
(RNA , DNA)

٨ ـ البروتينات النووية مثل :

البروتامينات ـ الهستونات .... الخ

٩ ـ البروتينات المخاطية مثل :

(EGGCHALAZA ?, OVAMUCOID)

١٠ـ البروتينات الدهنية مثل :
(CEPHALIN , LECITHIN)

١١ـ البروتينات الفوسفاتية مثل :

(PHOSPHOSERINE....الخ)

١٢ ـ البروتينات المعدنية مثل :

GLATATHIONE DEHYROGENASE ١١

١٣ ـ البروتينات الملونـة مثل :

(الهيموجلوبين ـ الميوجلوبين ..الخ)

ثانيا : الكربوهيـدرات

١ ـ السكريات البسيطة مثل : الجلوكوز ـ جلاكتوز فركتوز .... الخ

٢ ـ السكريات الثنائية والثلاثية مثل : سـكروز ـ مالتوز ....الخ

٣ ـ السكريات العديدة مثل : النشا ـ الجليكوجين ـ السيللوز... الخ

٤ ـ المركبات الوسيطة للتمثيل الغذائي

ثالثا : الدهـــــون

١ ـ الأحماض الدهنيـــة

٢ ـ الجلســريدات الأحادية والثنائية والثلاثية

٣ ـ الفوســـفوليبيــدات

٤ ـ الجلوكوليبيدات

٥ ـ الستيرولات

٦ ـ المركبات الوسيطه للتمثيل الغذائى

رابعا : الفيتامينات ونواتج تمثيلها الغذائى .

خامسا : الهرمونات والمواد الشبيهة لها مثل : الأنسيولين
ـ البروستاجلايوعين

سادسا : الأنزيمات

سابعا : العناصر والمركبات المعدنية

١ ـ العناصر المعدنية مثل (كبريت ـ صوديوم ـ كالسيوم ... الخ)

٢ ـ مركبات معدنية (الأحماض مثل : حمض الايدروكلوريك ـ حمض الكربونيك
قواعد وأكاسيد وأملاح معدنية)

٣ ـ غازات (أكسجين ـ ثانى أكسيد الكربون ـ
ميثان ...... الخ)

ثامنا : المركبات العضوية الأخرى :

١ ـ الكحولات

٢ ـ الأحماض العضوية

٣ ـ الاسترات

٤ ـ الألدهيدات

٥ ـ الكيتونات

٦ ـ الهيدوكربونات الأليفاتيه

٧ ـ المواد الحلقية

٨ ـ المواد العطرية

الفصل الأول

الاعـــداد العـــام للعينـــــــــات

أولا : الـــــــدم BLOOD

يتكون الدم بصفة عامة من جزء سائل FLUID PART يعرف بالبـلازما BLOOD PLASMA وجزء آخر يعرف بكرات الـدم أو المكونات الخلوية أو خلايا الدم BLOOD CELLS .

وهناك ثلاثة أنواع من هذه الخلايـــا :

١ ــ كرات الدم الحمراء ERYTHROCYTES OR RED CELLS

٢ ــ كرات الدم البيضاء LENKOCYTES OR WHITE CELLS

٣ ــ الصفائح الدمويـــة THROMOBOCYTES OR PLATELETS

واللون الأحمر للدم يرجع الى وجود كرات الدم الحمراء وليـــس للبلازما ، أما الأخيرة فهى سائل أصفر غير ملون تبعا لنوع الحيوان ونـــوع الفحص (كمية البلازما المفصولة) فمثلا فى بعض الأجناس تظهـــــــر

البلازما عديمة اللون عندما تفحص في طبقة رقيقة ، وفي أجناس أخرى تظهر البلازما عديمة اللون أو صفراء خفيفة عندما تفحص في كميات كبيرة وتظهر هذه الصفة في القطط والكلاب والأغنام والماعز وبصفة خاصة في الخيول ويظهر اللون واضح في البلازما .

واللون الأصفر المميز للبلازما أساسا هو عبارة عن افراز مرارى كلوى يعرف بـ BILIRULIN وبالتحليل الكيماوى ثبت أن البلازما سائل معقد التركيب جدا ويكون حوالى ٥٥ ـ ٧٠ ٪ من حجم الدم تبعا لاختلاف جنس الحيوان وحالته الصحية ، وتركيب بلازما الدم متشابهه الى حد كبير في الحيوانات المختلفة ويظهر تركيب البلازما من الجدول (١ ـ ٤) .

ويوضح جدول (٢ ـ ٤) المدى الطبيعى لمحتوى الدم من بعض المكونات الكيماوية فى حيوانات المزرعة كاملة النمو ، كما يوضح جدول (٣ ـ ٤) مكونات الهروتين فى بعض حيوانات المزرعة المختلفة .

يبين مكونات وتركيب بلازمـــا الـــــدم

1	WATER			مـــاء	١
2	GASES	OXYGEN O_2 CARBON DIOCIDE Co_2 NITROGEN N_2 ..... ETC	اكسجين ثاني اكسيد الكربون نيتروجين .....الخ	غـازات	٢
3	PROTEINS	ALBUMIN GLOBULIN FIBRINOGIN	البيومين جلوبيولين فبريتوجين	بروتينات	٣
4	GLUCOSE AND ITS DRIVETIVES	LACTATE PYRUVATE	لاكتـــات بيروفات	جلوكــوز ومشتقاته	٤
5	LIPIDS	FAT LECITHIN CHOLESTCROL ..... ETC	دهـــون ليثيـــين كوليســترول وغيرهـــا	ليبيدات	٥
6	NON - PROTEIN NITROGENONS SUBSTANCES	AMINO ACIDS UREA URIC ACID CREATINE CREATININE AMONIA ..... ETC	أحماض أمينية يوريـــــا حمض يوريـك كرياتــــين كرياتنيـــين أمونيـــا و... وغيرها	موا نيترو جينية	٦
7	ENZYMES			أنزيمـات	٧
8	HORMONES			هرمونـات	٨
9	VITAMINS			فيتامينا ت	٩
10	INORGANIC SUBSTANCES	CALCIUM POTASSIUM MAGNESIUM IRON CHLORIDE SULPHER PHOSPHATE	كالســيوم بوتاســيوم ماغنســيوم حديـــد كلوريـــد كبريــت فوســفات	مواد غـير عضـوية	١٠
11	TRACE ELEMENTS	COPPER COBALT ZENIC IODINE MANGENESE ..... ETC.	نحـــاس كوبلــت زنـــك يـــود منجـنيز .... الخ	عناصــر نـادرة	١١

جدول رقم ٣ ــ ٤

يوضح مكونات البروتين

في بعض حيوانات المزرعة المختلفة مقاسة بـ(جم / ١٠٠ مل من البلازما أو السيرم)

الحيوان	البروتين الكلى TOTAL PROTEIN في البلازما	الفيبرينوجين FIBRINOGEN في البلازما	البروتين الكلى في السيرم	الألبيومين	الجلوبيولين
الحصان	٦ر٨٤	٠ر٣٤	٦ر٥٠	٣ر٢٥	٣ر٢٥
الأبقار	٨ر٣٢	٠ر٧٢	٧ر٦٠	٣ر٦٥	٣ر٩٧
الأغنام	٥ر٧٤	٠ر٣٦	٥ر٣٨	٣ر٠٧	٢ر٣١
الماعز	٧ر٢٧	٠ر٦٠	٦ر٦٧	٣ر٩٦	٢ر٧١
الكلب	٦ر٧٢	٠ر٥٢	٥ر٢٠	٣ر٥٧	٢ر٦٣
القطط	—	—	٧ر٥٨	٤ر٠١	٣ر٥٧

عينـات الـدم : BLOOD SAMPLING

يستخدم للحصول على عينات الدم أحد المصادر التاليـة :

١ ـ الدم الشـعيرى CAPILLARY BLOOD

وهو يجمع بوخذ الابهام بابرة ثم بسـحب الدم باستخدام ماصة دقيقة ، ويمكن جمع الدم الشعيرى كذلك بوخذ كعب القدم فى الأطفال أوشحمة الأذن ٠

٢ ـ الدم الوريـدى VENOUS BLOOD

ويسحب من أى وريد بارز ، وغالبا مايكـون وريد الساعد فى الانسان أو الوريد الودجـى فى الحيوانـات ٠

٣ ـ الدم الشريانى ARTERIAL BLOOD

وهو قليل الاستخدام ويستخدم فى تقديـر

غازات الدم ودراسة الاختلافات في نسبة بعض المكونات بين الدم الوريدى والشريانى ٠

٤ ـ دم القلب HEART BLOOD

ويجمع من الطيور باستخدام سيرنجة وابرة طويلة تغرز فى عضلة عضلة الصدر حتى تصل الى تجويف القلب ويتم سحب الدم منها ٠
وهى عملية تحتاج الى خبرة وتدريب فقد يصعب على غير المدرب التمكن من الوصول الى تجويف القلب أو قد تؤدى عملية السحب معه لنفوق الطائر ٠

معالجة عينات الدم :

١ ـ اضافة مادة مانعة للتجلط

٢ ـ الطرد المركزى لفصل خلايا البلازما ٠

والبلازما BLASMA هى ناتج الطرد المركزى للدم المحتوى على الفبرينوجين ومانع التجلط ٠

والسيرم SERUM وهو ناتج الطرد المركزى

لدم غير المحتوى على الفبرينوجين ومانع التجلط •

موعد أخذ عينات الدم :

****

أفضل موعد هو الصباح الباكر للأسباب التالية :

****

١ – يكون الدم ممثلا لمرحلة مابعد الامتصاص •

٢ – تنظيم العمل اليومى فى معمل التحليل •

الاحتياطات اللازمة عند سحب عينة دم :

****

سوء التعامل مع عينة الدم يؤدى الى تكسر كرات الدم

الحمراء EMOBJSIS وتسرب محتوياتها الى

البلازما مما يؤثر على نتائج الاختبارات المختلفة •

اكتشاف التكسر :

****

يتم باستخدام المطياف SPECTROSCOPE

حيث يظهر اخره من الأوكسى هيمو جلوبين

OXY HEMOGLOBIN

ولتفادى ذلك يلزم مراعاة مايلـــــى :
****

١) سحب الدم ببطء مع استخدام أقل ضغـــط
ممكن على الذراع •

٢) تفريغ الحقنة فى الوعاء ببطء على أن يلامـــس
طرف الابرة جدار الوعـــاء •

٣) عدم اضافة كمية زائدة من مانع التجلـــط
ومزجها بالدم بالرج الدائرى الهادى •

٤) استخدام سرعة بطيئة أو متوسطة فى الطـــرد
المركـــــزى •

٥) فى حالة فصل السيرم أو البلازما يجب أن يتم
ذلك بأقصى سرعة ممكنـــــة •

أنواع مضادات التجلط ANTICOAGULANTS
****

١ ـ الهيبارـــــن : HEPARIN

فعلـــه : يثبط تحول البروثرومبين الى ثرومبين •

ميزاته : أفضل مضادات التجلط

١ ــ لايسبب تغير حجم كرات الدم الحمراء٠

٢ ــ ليس له تأثير ضار على اختبارات الدم٠

عيوبه : مرتفـع الثمـــــن ٠

٢ ــ EDTA :

فعلــــه : يرتبط بأيونات كا ++

ميزاته : لايغـــير حجم كرات الدم الحمراء ٠

٣ــ الاكســـالات : OXALATES

فعلهـــا : ترســب الكالســـــيوم ٠

الصور المستخدمة منها : اكسالات البوتاســيوم ٠

عيوبهـــا : تسـبب تسرب الماء من الخــلايا ٠

٤ ــ السترات : SITRATES

فعلهـا : تحول الكالسيوم الى صورة غير متأينـة .

عيوبها : ١ ــ تجعل البلازما غير ملائمة لتقديــــر الكالسيوم بهـــا .

٢ ــ تسبب تسرب الماء من الخلايـــــا (بدرجة كبيرة) .

٥ ــ فلوريد الصوديوم : SODIUM FLUORIDE

فعله : عامل حافظ PRESERVATIVE

اذ يثبط كل مــــن :

١ ــ التمثيل الغذائي لكرات الدم الحمراء .

٢ ــ الفعل البكتــــيري .

عيوبه : ١ ــ يؤثر على نتائج تقدير الانزيمات لكونـــه مثبط انزيمـــــي .

٢ ــ يلزم خلطه بالـ EDTA (أو اكسالات البوتاسيوم) .

التغيرات الحادثة فى الدم عند حفظــه :

١ ـ فقد ك أ ٢ :

ينتشر من الخلايا الى البلازما ومنها الى الهواء ← زيادة قلوية الدم . ويمكن التغلب على ذلك بـ :

أ ـ استخدام ملح منظـم BUFFER.

ب ـ استخدام حقنة معالجة بالهيبارين فى جمع الدم ثـم تشميع الابرة وحفظ الحقنة فى الثلج .

٢ ـ تحول الجلوكوز الى حمض لاكتيك GLY COLYSES .

٣ ـ تراكم الفوسفور غير العضوى فى البلازمـا ، لانفصاله من الاسترفوسفات الموجودة بالخلايا .

ولتفادى ذلك يجب سرعة فصل السيرم أو البلازما من العينة .

٤ ـ تكون الأمونيـا من المواد النتروجينية خصوصا اليوريـا .

ويحدث هذا فى الدم الملوث بالبكتريـا .

تفادى ذلك : حفظ الدم معقما أو مبردا .

٥ ـ نفاذ المواد من أغلفة خلايا الدم الحمراء :

خصوصا البوتاسيوم (لارتفاع تركيزه داخل الخلايا)

تفادى ذلك : سرعة فصل السيرم أو البلازما من العينة.

٦ ـ تحول البيروفات الى حمض لاكتيك :

تفادى ذلك : سرعة مزج الدم بمرسب البروتين .

أنواع عينات الدم :

١ ـ الدم الكامل : WHOLE BLOOD

حالات استخدامه :

أ ـ الاختبارات السريعة (مثل اختبار الأمونيا)

ب ـ فى حالة تركز المادة المختبرة فى الخلايا (مثل الهيموجلوبين)

حـ ـ تقدير الجلوكوز واليوريا .

٢ ـ المصل (السيرم) : SERUM

هو ناتج الطرد المركزى للدم غير المحتوى على الفبرينوجين ومانع التجلط) .

ويستخدم لعدد كبير من الاختبارات مثل : البروتينات ، الاحماض الأمينية ، الدهـــون ٠٠٠٠٠ الخ

٣ ـ البلازمـــا : PLASMA

هي (ناتج الطرد المركزى للدم المحتوى علـــــى الفيبرونوجين ومانع التجلط) .

استخدامها : الامونيا ، الكلوريد ، البيكربونات ٠٠٠٠الخ

٤ ـ كرات الدم الحمراء : RED CELLS

تستخدم لتقدير : الجلوكوز ـ ٦ ـ فوسفات ، الهيموجلوبـــين ، بعض الانزيمـــات .

ازالة بروتينات الـــدم :

أهم المواد المستخدمـــة :

١ ـ حض التنجستك	GSTIC A.
٢ ـ " ترای کلور أسيتيك	HLORACETIC A.
٣ ـ أملاح الزنك القلوية	LEALIN ZINC SALTS
٤ ـ كبريتات الكدميوم	CADMIUM SULPHATES
٥ ـ المذيبات العضوية	ORGANIC SULPHATES
٦ ـ الفصل بالانتشار الغشائى	DIALYSES

حمض التنجستك :

الجواهر REAGENTS المستخدمة هى :

تنجستات صوديوم + حمض كبريتيك

ويجب أن يكون المحلول قلويا بدرجة بسيطة
(مع الفينولفثالين) .

حمض التراى كلور أسيتيك :

مميزاته :

١ ـ يعطى راشح حمضى ولذلك يفيد فى التقديرات
التى تحتاج الى وسط حمضى .

٢ ـ يعطى مقدار أكبر من الراشح (لنفس الكمية من
الدم) .
٣ ـ أسرع ترشحا من التنجستك .
٤ ـ لا يرسب النتروجين غير البروتينى .

أملاح الزنك القلوية :

يستخدم محلولين :

كبريتات زنك + ايدروكسيد صوديوم

عيوبهـــا :

ترسيبها لبروتينات البلازما لا يكون تاما .

كبريتات الكدميوم :

مميزاتهـــا :

١ ـ لاتسبب تسرب أملاح مع الراشح .

٢ ـ ترسب موانع التجلط (وجود كميات كبيرة منهـــا
تعاكس ترسيب البروتينات) .

المذيبات العضويــة :

فصلها :

ازالة الماء من جزيئات البروتين .

عيوبهـــا :

١ ـ قد ترسب بعض المواد المراد تقديرهـــا .

٢ ـ ترسب البروتينات لا يكون تاما .

الفصل بالانتشار الغشائي :

حساسية الأغشية عادة تكون منخفضة مما يقلل مرور

الجزيئات الصغيرة خلالها .

وهناك أساليب لرفع حساسية الأغشية تستخدم

بنجاح في جهاز الـ AUTO-ANALYZER

قياس الدم MEASURING BLOOD

الماصات العادية تصلح لقياس السيرم والبلازما ولا تصلح لقياس الدم الكامل نظرا لارتفاع لزوجته ، واذا استخدمت لذلك تنتج أخطاء ملموسة .

لذلك تستخدم ماصات خاصة للدم الكامل تدرج بطريقة مناسبة لقياس كمية معينة من الدم :

١ - ماصات تقيس حجوم صغيرة : ١ر٠ - ٢ر٠ سم^3

٢ - ماصات تقيس حجوم كبيرة : أكبر من ذلك .

وتستخدم محاليل معينة لمزج الدم وقد يجرى غسيل الدم من الماصة باستخدام هذه المحاليل .

ثانيا : البول URINE

البول عبارة عن محلول من نواتج التمثيل الغذائي للنيتروجين والكبريت والأملاح غير العضوية والصبغات ، وهو سائل أصفر عادة ولكن هناك اختلافات واسعة ، فاللون يختلف باختلاف الحيوانات .

والبول عادة يكون مائي القوام ، ولكن في الحصان يكون أكثر لزوجة نتيجة الافرازات المخاطية من حوض الكلية والجزء العلوى من الحالب .

وفي بعض الحيوانات يكون البول رائق ولكن في الحصان فان البول يظهر عكرا نتيجة لوجود بلورات معلقة من كربونات الكالسيوم ، ولذلك فان البول في المجترات يظهر بالمظهر العكر عند وضعه في اناء فترة من الوقت نتيجة لوجود ترسيبات من بعض الأملاح .

الكثافة النوعية للبول SPECIFIC GRAVITY

الكثافة النوعية للبول عموما تنخفض مع زيادة حجم البول في اليوم كما أنها تختلف باختلاف نوع الحيوان .

والجدول رقم (٤ ــ ٤) يوضح هذه الاختلافات .

جدول (٤ ــ ٤) :

الكثافة النوعية لبول بعض حيوانات المزرعة

الحيوان	الكثافة النوعية للبول	الحيوان	الكثافة النوعية للبول
الحصان	١٠٠ر١	الخنزير	١٢٠ر١
الثور	٣٢٠ر١	القط	٣٠٠ر١
الأغنام والماعز	٣٠٠ر١	الانسان	٢٠٠ر١
الكلب	٢٦٠ر١		

تفاعل البول : REACTION OF URINE

يختلف تفاعل البول باختلاف الأجناس ومن وقت الى وقت فى الحيوانات نفسها ، ويتوقف تفاعل البول أيضا على نوع الغذاء والغذاء وكفاءة الأيض الغذائى METABOLISM

وكأى محلول يقاس تفاعل البول بالتركيز النسبى لأيونات الأيدروجين والهيدروكسيل (OH^-) (H^+) فاذا كان الأيون

الأول هو السائد فان البول يصبح حامضى ، أما اذا ساد الأخير فان البول يصبح قاعدى التفاعل ٠

فى آكلات اللحوم بصفة عامة ذات بول حمضى أما آكلات العشب فهى غالبا ذات بول قاعدى ، أما خليطات الأغذية فهى ذات بول حامضى أو قاعدى تبعا لنوع العليقة ٠

بعض مواد الغذاء تسبب ارتفاع حموضة البول لاحتوائها على عناصر ذات تفاعل حامضى مثل الفوسفور والكبريت بينما العديد من الأغذية الخضراء يسبب زيادة قلوية البول لاحتوائها على عناصر ذات تفاعل قاعدى مثل (الصوديوم والبوتاسيوم والكالسيوم والماغنسيوم) ٠

كميـة البـول :

تختلف كمية البول المفرزة يوميا باختلاف نوع الغذاء ــ الجهد ــ درجة الحرارة الخارجية ــ وكمية الماء المأخوذ وفصل السنة ٠ كذلك هناك اختلاف فى كمية البول تبعا لنوع الحيوان كما هو موضح فى جدول (٥ ــ ٤) ٠

جدول (٥ ـ ٤) :

يوضح كمية البول اليومي في بعض حيوانات المزرعة

(كمتوسط باللتر)

الحيوان	كمية البول اليومي باللتر	الحيوان	كمية البول اليومي باللتر
البقرة الحلوب	٧ر٤	الكلب الكبير	ـر٤
الأغنام والماعز	٢ر١٤	الانسان	ـر١
الخنزير	ـر١		

تركيب البول :

التركيب الكيماوي للبول معقد جدا .

وهو بذلك راجع لأنه يكوّن من الدم ، والجدول (٦ ـ ٤) يوضح المكونات الأساسية للبول في الحالات الطبيعية .

ومع أن كميات قليلة من نواتج الاخراج وخاصة للمواد ـ الأزوتية تخرج عن طريق العرق واللعاب واللبن ـ الا أن البول هو المخرج الأساسي لهذه المواد .

جدول (٦ ــ ٤) :

المكونات الأساسية للبول فى الحالات الطبيعية

١	المـــاء	WATER
٢	اليوريــا	UREA
٣	حمض اليوريك	URIC ACID
٤	اكرياتنـــين	CREATININE
٥	البيوريـــن	PURINE
٦	الأكترنســتين	XANTHINE
٧	الآلنـــتين	ALLENTIN
٨		CHIPPARIC AEID
٩	مركبات كبريتية متعـــادلة	
١٠	أملاح غير عضـويـــــة	
١١	صبغـــات	UROBILLIN

فى الثدييات تكون اليوريا هى الأساسية لنواتج اخــراج الأزوت وتكون نسبة حمض اليوريك ضئيلة جدا والعكس فـــى الطيور أن يكون المنتج الأساسى لاخراج الأزوت هو حمـــض اليوريك ونسبة اليوريا تكون ضئيلة جـدا .

عينـات البـول : URINE SAMPLES

١ ـ عينات فرديـة : SINGLE SPECIMENS

تستخدم فى حالة الفحوص الاستطلاعية والاختبارات الوصفية ٠

٢ ـ عينات ٢٤ ساعة : 24 h SPECIMENS

تستخدم فى حالة الاختبارات الكمية ٠

وفيها يجمع بول المريض أو الحيوان على مدار ٢٤ ساعة كاملة ٠

الطريقـة :

يفرغ المريض أو الحيوان مثانته فى وقت محدد (٨ ص مثلا) ثم يجمع كل البول الناتج فـى ذلك اليوم وأثناء الليل وكذلك ٨ ص فى اليـوم التالى ٠

التغيرات الحادثة فى البول نتيجة لحفظــه :

١ ـ الفعل البكتيرى : BACTERIAL A CTION

أ ـ تحول اليوريا الى كربونات أمونية ←— رائحة أمونيا •

ب ـ تغير الكلـوكــــوز •

لذلك يجب حفظ عينة الـ ٢٤ ساعة ـ تحت الجمع ـ فـــى وعاء نظيف •

٢ ـ ترسب الفوسفات : PRECIPITATION OF PHOSPHSTES

يحدث اذا صار البول قلويا (يمكن اعادة ذوبانها باضافة قليل من الحمض) •

٣ ـ ترسب حمض اليوريك واليورات :- PRECIPITATION OF URIC A. 4 URATES :

تترسب عند الحفظ لأنها أقل ذوبانا فى البــــول البارد (يمكن اذابتها بالتدفئة) •

٤ ـ أكسدة حمض الاسكوربيك : oxidation of
OXIDATION OF ASCURBIC A. :

تحدث بسرعة فى البـــــول •

٥ ـ أكسدة اليوروبلينوجين الى يوروبيلين :

UROBILINOGEN —SOXIOLATION— UROBILIN

المواد الحافظة للبول PRESERVATIVES FOR URINE

تستخدم لمنع التغيرات السابقة عند الاضطرار لحفظ البول لفترة معينة .

يتم اختيارها على أساس الغرض من جمع البول .

١ ـ الأحماض :

استخدام ١٠ سم^3 يد كل مركز يكفى لحفظ عينة الـ ٢٤ ساعة .

وهناك حالات لا يستخدم فيها الحمض :

أ ـ تقدير الستيرويدات STERIODS

ب ـ تقدير اليوروبيليتوجين ، البورفوبيلينوجين PORPHOBILINOGEN

(فى هذه الحالة نستخدم وسط قلوى) .

٢ ـ التولويـــن والبترول الخفيف :

TOLUEN OF LIGHT PETREUM

فعلها :

تكون طبقة عازلة على سطح البـــــول

(أى تمنع المزيد من التلوث السطحى بالبكتريا

دون أن تعمل على وقف نشاط البكتريا الـــتى

وصلت فعلا) •

٣ ـ الكلوروفـــورم : CHLOROFORM

فعله :

١ ـ يمنع التلوث الســطحى •

٢ ـ يوقف نشاط البكتريا السابق دخولها •

عيوبـــه :

يختزل محلول فهلنج ـــــــ نتيجـــة

موجبة عند الكشف عن الجلوكـــــوز •

٤ ـ الثيمــول : THYMOL

يستخدم فى صورة متبلرة ، أو فى صورة محلول فـــى

الأيزوبروبانول (أكثر فائدة) .

٥ ـ الفورمالـــين : FORMALIN

يستخدم منه ٣ ـ ٤ نقط / ١٠٠ سم^{3} بول .

واذا زاد عن ذلك يعطى نتائج موجبة مع اختبـــارات الجلوكـــــوز .

ثالثا : الـــبراز

تركيـــبه :

١ ـ نواتج هضم غير ممتصة + أجزاء غير مهضومة + أجزاء غير قابلة للهضم

٢ ـ مواد مفرزة من الأمعاء : انزيمات ـ مخاط ـ صفراء .

٣ ـ خلايا من جلد الأمعاء وخلايا دموية .

٤ ـ نواتج الفعل البكتيرى على الأغذية INDOLE , AKATOLE , أحماض أمينية .

٥ ـ بكتريـــا .

٦ ـ مـــــــاء ٠

٧ ـ مـواد صلبة وطفـيليات ٠

جمعـــه :
****

يجمع فى أوعية خاصة ويسمى فى المرة الواحدة STOOL

وأنواع العينـــات :
****

١ ـ جزء من STOOL:
****

تختار بعناية كما فى عينات البراز المرقم ٠

٢ ـ كل الــــبراز :
****

كمـا فى اختبارات معامل الهضم والتمثيل

الغذائى بدون المرقم ٠

الاحتياطـــات :
****

١ ـ عدم اختلاط البول بالــبراز ٠

٢ ـ عدم استخدام البراز الناتج بعد اعطاء حقنة شرجية ٠

٣ ـ عدم استخدام البراز المحتوى على زيت البارافين/ أملاح الباريوم

الكشف عن اختلاط البول بالبراز :

الفكـرة :

تركيز أيون الكلوريد فى البول مرتفع ، وفى البراز منخفض .

الطريقة :

١ – يخلى جزة من البراز مع الماء المقطر ⟵ (ترشيح) راشح

٢ – الراشح + نترات فضة + حمض نستريك

لون لبنى ∴ لايوجد تلوث

راسب ∴ يوجد تلوث

حفظ البراز :

اما أن تختبر العينة فور أخذها أو تحفظ فى الثلاجة أو تجفف فى حمام مائى .

وقد تجرى المعاملات التالية :

١ – اضافة حمض : فى حالة تقدير النتروجين .

٢ – " فورمالين : بكمية قليلة .

ترقيم الـــبراز MORKING FECES

عند تقدير الموازين (مثل ميزان النتروجين) يجـــرى على كل ناتج البول والبراز لمدة ٣ ـ ٤ أيام وهنا يكون جمع البراز أكثر صعـــوبة .

١ ـ استخدا م الصبغـــات :

المواد المستخدمة :

القرمز ، صبغة الجنطى البنفسجية
GENTION VIOLET ,
الفحـــم النبـــاتى .

الفكـــــــرة :

استخدام هذه المواد فى تحديد بدايـــة ونهاية التجربة .

الطريقـــــة :

يـــعطى ٥ر٠ ـ ١جم من احداها فـــى كبسولات قبل الافطار فى أول صباح للتجربـــة ويكرر ذلك فى آخر أيام التجربة (عند توقـــف

جمع البول) •

وناخذ أول عينة براز بها الصبغة وكل ناتج البراز التالى حتى تظهر الصبغة للمرة الثانيـــة فتستبعد هذه العينة •

٢ ـ استخدام اكسيد الكروميوم Cr_2O_3

أ ـ تعطى منه كبسولات (٥ر جم) واحدة مع كل وجبـــة رئيســـية ويجمع ناتج البراز ويجفف •

ب ـ تؤخذ عينة يقدر فيها الأكسيد عن طريق أكســـدته الى DICHROMATE ٠

جـ ـ الناتج اليومى من البراز = كمية البراز المحتوية علـــى ٥ر١ جم من الأكسيد •

الفصل الثانى

اعداد العينات للتحليلات الخاصة

فى الفصل السابق تعرضنا لكيفية التعامل مع العينات بصفة عامة وكيفية الحصول عليها واعدادها للتحليلات عموما ٠ واعداد العينات بهذه الكيفية يهيئ العينة فى صورة قابلة لتحليل معظم المكونات الأساسية فعلى سبيل المثال يكفى لتقدير بروتينات الدم أو دهون الدم أو انزيمات الدم ٠٠٠٠٠ وغيرها حصولنا على عينة من الدم ثم فصل مصلها أو سائلها (السيرم والبلازما) بالطرد المركزى ، كما يكفى حصولنا على حجم البول لتقدير العديد من المكونات من هذا الحجم مباشرة ، ولكن فى بعض التحليلات لا يقتصر الأمر على هذا الاعداد وانما لابد من تجهيز العينات تجهيزا خاصا لتناسب تحليلا خاصا ٠ وفى هذا الفصل سوف نتناول أمثلة لهذا الاعداد ٠

١ ـ اعداد العينات لتقدير العناصر المعدنية :

جميع العينات الحيوية تحتوى على مواد عضوية بسيطة أو معقدة التركيب ، وقد تكون العناصر

المعدنية داخلة فى تركيب هذه المواد العضوية أوخارجة عنها وتسمى تلك العناصر الداخلة فى تركيب المادة العضوية بالعناصر المعدنية العضوية ومن أمثلتها وجود الفوسفور فى الأحماض النووية ووجود الكبريت فى الاحماض الأمينية ووجود الحديد فى الهيموجلوبين ووجود الكوبلت فى الكوبالمين (VIT. B_{12}) ووجود السيلينيوم والزنك والماغنسيوم ..... وغيرها فى تركيب العديد من الانزيمات .

كما أن بعض العناصر قد تكون فى صورة غير عضوية فى السائل المحتوى على المادة العضوية ، وفى جميع هذه الأحوال وسواء كان الهدف هو تقدير نسبة الجزء العضوى أو غير العضوى من هذه العناصر المعد يلزم الأمر التخلص من المادة العضوية من العينة قبل اجراء التحليل عليها ويتم ذلك بطرق مختلفة

أهمها طريقتان هما :

أ ـ الحرق ASHING

ب ـ الهضم DIGESTION

١ ـ الحـرق ASHING

ويتم ذلك بتعريض العينة الى درجة حرارة عالية حوالى ٥٠٠ ـ ٦٠٠ °م وبذلك تـتم اكسدة المادة العضوية تماما الى ثانى اكسيد الكربون والماء وتبقى المادة المعدنية فقـط (الرماد) حيث يمكن اذابته فى الأحماض المخففة أو المركزة أو القواعد القوية للحصول على مستخلص قابل للتحليل حسب العنصر المراد تقديره على وجه التحديد ٠

ومن عيوب هذه الطريقة أنها تحتاج الى وقت طويل والى عينات كبيرة والى جهد وخطوات متعددة للحصول على الرماد ثم على المستخلص الرائق المناسب ٠ ومن عيوبها أيضا أنهـا غير مناسبة لتقدير العناصر المعدنية فى السوائل الحيوية مثل البلازما أو مصل الدم أو السائـل المنوى ٠٠٠٠٠ وغيرها ٠

الا أنه من اكبر عيوبها احتمال حـدوث تطاير لبعض العناصر المعدنية وبالتالى لا تكون

النتيجة المتحصل عليها بعد التحليل دقيقـــة
ومن أمثلة ذلك تطاير جزء من الفوسفور والكلـــور
أثنـاء عملية الحـــرق •

وللتخلص من هذا العيب نلجأ الى اضافة
مواد رابطه لهذه العناصر المتطايره قبل اجـراء
عملية الحرق •

(١) ـ عند حرق المواد العضوية بهدف تقدير
الكلوريدات في المستخلص الخالي مـــن
المادة العضوية يجب اضافة وزنا مســـاويـا
لوزن العينة الجافة من أكسيد الكالسيوم
ويعجن المخلوط جيدا بقليل من المـاء
المقطر ثم يجفف على حمام رملي ثم يحـرق
ثم يستخلص الرماد ٣ ـ ٤ مـــرات
بواسطة حمض النيتريك الساخن المخفف
بنسبة جزء من الحمض المركز النقي كثافة
٤٢ ر١ الى أربعة أجزاء من الماء المقطر •

(٢) ـ عند حرق المواد العضوية بهدف تقدير
الفوسفور في المستخلص الخالي من المادة

العضوية ، يجب اضافة محلول خـــلات الكالسيوم تركيز ٢٠ ٪ الى العينة ثـــم خلطها جيدا وتجفيفها تحرق ويتم استخلاص الرماد ٣ ـ ٤ مرات بواسطة حمـــض النيتريك الساخن قوة ٢ عيارى ٠

(٢) أما في حالة تقدير معظم الكاتيونات فـيتم حرق المادة العضوية مباشرة واستخـلاص الرماد بحمض الايدروكلوريك ٦ عيـــارى تقريبا ٠

ب ـ الهضـــم DIGESTION

ويستخدم لذلك الأحماض والقلويات القوية المؤكسدة أو المواد المؤكسدة الأخرى مثـــل فـوق أكسيد الأيدروجيـن ، ويختلف ذلك حسب الطريقة والعنصــــر المـراد تقديـــره ٠

ومن أشهر أنواع ذلك الهضم ما يلي :

(١) الهضم باستخدام حمض البيروكلوريك :

يضاف حمض البيروكلوريك

PERCHLORIC ACID

بتركيزات تتراوح بين ١٠ ـ ٢٥ ٪ ـ ويسخن على درجات حرارة تختلف حسب الأحوال فيؤكسد حمض البيروكلوريك المادة العضوية الى ثانى أكسيد الكربون والماء ، ويتكون محلول رائق يحتوى على المادة المعدنية فى صورة زائبه وهذه الطريقة مناسبة لهضم المادة العضوية السائلة مثل مصل الدم والبلازما والسائل المنوى وغيرها . كما أنها مناسبة لتقدير العناصر المعدنية مباشرة فى أجهزة القياسات الضوئية

SPECTROPHOTOMETERS

(٢) الهضم باستخدام حمض الكبريتيك :

يضاف حمض الكبريتيك المركز بكمية مناسبة ويسخن على درجة حرارة هادئة أو متوسطة حتى يتكون المحلول الرائق وهذه الطريقة تناسب هضم المواد العضوية الصلبة مثل الأغذية والأعلاف والأنسجة مثل العضلات والأعضاء وغيرها .

وهذه الطريقة مناسبة جدا لتقدير الأزوت بطريقة كلداهل ، وقد تستخدم للمساعدة على اتمام عملية الهضم مواد أخرى مع حمض الكبريتيك المركز مثل :

السيلينيوم وسلفات البوتاسيوم وسلفات النحاس وفوق أكسيد الأيدروجين •

كما يستخدم حمض الكبريتيك بتركيزات أخرى مع فوق أكسيد الأيدروجين بغرض تجهيز العينات العضوية لتقدير العناصر المعدنية الأخرى ، وهذه الطريقة مناسبة لتقدير العناصر المعدنية فى الدم والسوائل الحيوية •

(٣) الهضم باستخدام الأنزيمات :

وفيها يتم الهضم بواسطة أنزيمات مختلفة وذلك بهدف تقدير عناصر معدنية داخل تراكيب عضوية خاصة •

٢ ـ اعداد العينات لتقدير مكونات عضوية دقيقة :

والهدف من هذا الاعداد احداث تحلل مبدئي لتحويل مواد عضوية معقدة الى أخرى بسيطة مثل تحلل البروتينات الى أحماض أمينية حرة أو تحويل النشا أو السيللوز الى سكريات بسيطة حتى يمكن فصلها وتقديرها وذلك بالطرق التالية :

أ ـ الغليان مع أحماض أو قلويات معدنية قوية سواء تحت الضغط الجوى أو تحت ضغط عالى وسواء فى جو الحجرة أو بمعزل عن الأكسجين وهذه الطريقة هى الأكثر شيوعا فى تحلل البروتينات لتحويلها الى أحماض أمينية ويستخدم فيها واحدة من المواد التالية :

(١) حمض الايدروكلوريك ٦ عيارى

(٢) حمض الكبريتيك ٨ عيارى

وذلك بغليان المادة العضوية بما يعادل من ٥ ـ ١٠ أضعاف وزنها من أحد هذين الحمضين لمدة من ٦ ـ ٢٤ ساعة .

(٣) حمض الايدروبوديك

(٤) حمض الاكساليك

(٥) ايدروكسيد الصوديوم ٥ عيارى

(٦) ايدروكسيد الباريوم المشبع

(٧) خليط من حمض الفورميك والأيدروكلوريك

ب ـ المعاملة ببعض أحماض السلفونك طويلة السلسلة

مثـــل :

(١) DIPHENYL BENZENE SULFONIC ACID

(٢) CETYLSULFONIC ACID

ج ـ المعاملة بالانزيمات الهاضمة وهى أكثر استخداما مع هضم النشا والدهون ٠

انحلال المواد الصلبة والطريقة لتقدير الأحماض الأمينية

وهذه الطرق مناسبة لتحلل مواد صلبة أو طرية أو نصف سائلة مثل

الاغذية والاعلاف والانسجة والبيض وأجسام الحيوانات والطيور وهـــى :

١ ــ الانحلال الحمضـى ACIDIC HYDROLYSIS

يضاف حمض ايدروكلوريك ٦ عيارى الى المادة المـــراد تحليلها والتى يجب أن تكون مطحونة طحنا ناعما أو مفرومـة ومتجانسة وذلك فى أنبوبة تحلل خاصة مصنوعة من زجـــاج يتحمل الضغط ويمكن صهرها بسهولة ٠

ثم يسخن هذا الخليط قليلا لطرد الأكسجين الذائـــب ويمرر غاز أزوت لاحلاله محل الاكسجين فى الهواء الموجــود (أعلى السائل فى الانبوبة) ثم تقفل الانبوبة بصهر الطرف العلوى منها باحكام ، كما يجب تنقية غاز الأزوت من الأمونيا بامراره فى حمض PYROGALLIC ACID فى أيدروكسيد الصوديوم ٤ عيارى مثل استخدامه لهذا الغرض وتوضع الأنبوبة فى فرن على درجة حرارة ١٠٦° ــ ١١٠° م وتترك حتى يتم الانحلال تماما وتتحول محتويات الأنبوبة الـى محلول رائـــق ويســـتغرق ذلك مـــن ١٨ ــ ١٤٤ ساعة ٠ وعندئذ تفتح الأنبوبة ويبخر حمـض الأيدروكلوريك تحت ضغط منخفض ٠

أ ـ الأكسدة بحمض PERFORMIC ACID

في الانحلال الحمضي يحدث فقد لبعض الأحماض الأمينية الكبريتية ، لذلك لا يعتبر هذا الهضم مناسبا لتقدير أحماض الميثايونين والسستين والسستيئين ، ويستخدم لم حمض PER FORMIC

يتحول كل من السستين والسستيئن الى SYSTEIC ACID ويتحول الميثايونين الى ميثايوتين سالفون بينما يحدث تلف للتريتونان .

يضاف الى ما يعادل ٢ ـ ٥ ملجم بروتين أو.مل (وتحتوى على ٢٥ نانومول) حوالى ٢ مل من حمض PER FORMIC ACID ويترك المخلوط على درجة الصفر لمدة ٤ ساعات .

وفى بعض أنواع البروتينات قد يترك التفاعل لليوم التالى . وفى النهاية يوقف التفاعل بالتجميد المفاجئ للمخلوط ثم تسيله ، وتجرى عليه عمليات الانحلال الأخرى بالطريقة السابقة .

ب — S - CARBOXYMETHYLCYSTEINE

وفى هذه الطريقة يمكن تقدير مجموعة

فى بناء البروتين SULPHOHYDRYL

والتى توجد فى الحمض الأمينى السستئين ٠

سبق أن عرفنا أن الأكسدة بحمض

PERFORMIC ACID

وان كانت تمكن من تقدير الاحماض الأمينية

الكبريتية التى تتطاير مع الانحلال الحمضى

الا أنها تقدر كل من السستين والسستيئين على

صورة مركب واحد هو حمض

SYSTEIC ACID

وميزة هذه الطريقة أنها تحدد هل كل السستيئين

الموجود فى البروتين يوجد على صورة (S - S)

أى سستين أم لا أو بمعنى آخر تمكن من تقدير

كل من السستين والسستيئين كل على حده ٠

ويتم ذلك بربط مجموعة ($^{-}$SH)

الحرة بحمض IODOACETIC ACID أو

IODOACETOMIDE ثم يتم التحليـــل باستخدام حمض الأيدروكلوريك كما سبق توضيحه في الانحلال الحمضي ٠

٢ ـ الانحلال القلـوى AIKALINE HYDROLYSIS

ومن عيوب طرق الانحلال الحمضي أن الحمض الأميني التربتوفان يفقد أثناء الانحلال وقد تمكن كل من KNOX ومساعديه سنة ١٩٧٠ ، و PON ومساعديه سنة ١٩٧٠ من تعديل طريقة الانحلال القلوى باستخدام أيدروكسيد الباريوم ، وبذلك يمكن الحفاظ على ٩٥ ٪ من نسبة التريبتوفان في البروتين بعد انحلاله ٠

وفيها تنقل العينة الى أنبوبة الانحلال ويضاف اليها ايدروكسيد الباريوم ويتم التخلص من الاكسجين الذائب والهوائي كما في الطريقة السابقة ثم يترك المحلول على درجة ١١٠°م لمدة ١٦ ـ ١٨ ساعة ٠

بعد أن يروق المحلول يعادل المحلول بحمض كبريتيك مناسب التخفيف حتى درجة حموضة (PH) ٢

فيترسب الباريوم على صورة كبريتات باريوم تفصل بالطـــــرد

المركزى للحصول على المحلول الرائق المتحلل ٠

وهناك طرق أخرى للتحليل القلوى فى العينات الـتى

تحتوى على التريتوفان منها الطريقة التى أشار اليهـــــا

LOIU , CHANG'S سنة ١٩٧١ وفيها يســـتخدم

حمض P. TOLUENESULPHONIC

قوة ٣ عيارى بدلا من حمض الأيدروكلوريك ٠

وهذه الطريقة تكون مناسبة لانحلال العينات الـتى

تحتوى على نسبة من الكربوهيدرات تزيد عن ٥٠ ٪ ٠

وبعد تمام الانحلال تعادل حموضة العينة بواسـطة

أيدروكســيد الصوديوم ٠

هذا وقد وجد PENKE ومساعديه ســنة ١٩٧٤

أنه يمكن الاستعاضه عن حمض P- TOLUENESULPHONIC

بحمض MERCAPTOETHANE SULPHONIC

٣ ـ الانحلال الأنزيمي للبروتـــين :

يمكن استخدام أنزيمات مختلفة متخصصة لفك الروابط البيكدية في السلاسل البيتيدية ، ومع ذلك فلا توجـــد طريقة عملية دقيقة لمعرفة الوقت الذى يتم فيه الهضم بهذه الكيفية المطلوبة ٠

ويستخدم لذلك أنزيمات محلله للبروتين منها :

أ ـ التريبسين	TRYPSIN
ب ـ الكيموتريبسين	CHYMOTRYPSIN
جـ ـ الكربوكس ببتيد يز	CARBOXYPEPIDASE
د ـ البيبســــين	PEPSIN
هـ ـ	ENDOPEPTIDASE
و ـ	DIPEPTIDASE
ز ـ	AMINOPEPTIDASE

عينات البلازما PLASMA SAMPLES

تقدير الأحماض الأمينية في البلازما تعوقه مشكلتان هما :

١ ـ فصل الأحماض الأمينية عن جزئيات المواد البروتينية الأخرى عالية

الوزن الجزيئى ٠

٢ ـ فصل أميدات الجلوتامين والاسـبراجين ٠

وللتغلب على هاتين المشكلتين تتبع طرق مختلفة منها :

أ ـ طريقة حمض البكريـك :

وهذه الطريقة نشرها MOORE , STEIN

سنة ١٩٥٤ وتتلخص فيما يلـى :

يضاف الى ٤ مل من البلازما ٤ مل من

حمـض البكريك PICRIC ACID

تركيز ١ % ٠

وبعد الخلط تفصل العينة بالطرد المركزى

(السرعة العالية) لمدة ١٠ دقائق على جهاز

طرد مركزى صغـير ٠

ب ـ طريقة حمض SULPHOSALICYCLIC ACID

وهذه الطريقة نشرها MONDINO

ومساعده سنة ١٩٧٢ وفيها تعامل البلازما بحمض
SULPHOSALICYCLIC ACID

وذلك بتحضير محلول من ذلك الأخير في محلول

منظم BUFFER من سترات الليثيوم

٣ر٠ عياري 0.3N LITHIUM CITRATE

ويضبط عند pH 1.8 ويضاف من هذا

المحلول ٤ مل الى ١ مل من البلازما ويخلط ثم

يفصل المخلوط بالطرد المركزي على سرعة ١٠٠٠

R. P. M. لمدة ١٠ دقائق على درجة

الصفر المئوى ٠

جـ ـ طريقة الطرد المركزى العالى :

أمكن فصل البلازما بالطرد المركزى العالى

لفصل الجزئيات العالية الوزن الجزيئي من البروتينات

وغيرها عن الأحماض الأمينية الحرة كوسيلة لتنقيتها

قبل فصل الاحماض الامينية كروماتوجرافيا ٠

وفيما يلى السرعات التي اقترحها بعض الباحثين :

١ ـ (١٨ ألف لفة في الدقيقة 18000 R.P.M.)

لمدة ٣٠ دقيقة على درجة الصفر المئـــــوى

اقترحها GERRITSEN وساعديه

سنة ١٩٦٥ ٠

٢ ـ (٣٦٨ ألف لفة في الدقيقة R.P.M. 368000)

لمدة ٣٠ دقيقة على درجة ٨°م اقترحهـــــا

BENSON وساعديه سنة ١٩٦٧٠

د ـ طريقة الترشـــيح :

وصف EAKER سنة ١٩٧٠ طريقـة

لترشيح البلازما بمرشحات الجيل GELFITRATION

لفصل الجزيئيات البروتينية العالية الوزن الجزيـئى

عن الاحماض الأمينية ٠

وهذه الطريقة مناسبة لفصل العديد مـــن

العينات الفسيولوجية مثل البلازما ومصل الدم

والبـــــول والســـوائل البينيـة

وغـــيرها ٠

هـ ـ طريقة الترسيب :

وفيها يتم ترسيب البروتينات الأخرى عن الاحماض الأمينية بالمواد المرسبة للبروتين مثل

TRICHLOROACETIC ACID
و
TUNGESTATES

ثم ترشح .

عينات البول URINE SAMPLES

يفضل عندما يراد الكشف عن وجود الأحماض الأمينية فى البول أن يجمع بول ٢٤ ساعة كاملة ، ويحفظ على درجة ٤° مئوية ويضاف اليه ١ ـ ٢ مل تولوين أو كلوروفورم أو بلورة من THYMOL لمنع نشاط البكتريا .

يتم تحليل البول بعد اعداده باحدى الطرق السابقة .

الا أنه يراعى مايلى :

اذا كان يراد تقدير الأحماض الأمينية الحمضية :

يضبط تفاعل البول على درجة ٢ ـ ٢ر٢ pH

ثم يستخدم للتحليـــــل •

أما اذا أريد تقدير الأحماض الأمينية القاعدية :

فيجب التخلص من الأمونيا وذلك بأن يؤخذ

٥ مل من البول وتضبط على pH ١١ ــ ١٢

باستخدام محلول أيدروكسيد الصوديوم ٢ عيـــارى

ويبخر فى مجفف زجاجى فوق حمض الـكبريتيك المركـز

ثم يضبط تفاعل العينة الجافة على ٢ر٢ pH

بواسطة حمض أيدروكلوريك ٢ عيارى لتكوين محلــول

منظم BUFFER حجمه ١٠ مل وتفاعلــه

٢ر٢ pH يكون معدا للتحليل •

الباب الثالث

تقييم المنحنيات القياسية

مقدمـة :

تقييم منحنيـــات القيـــاس

المقصود بتقييم منحنيات القياس أكثر من معنى تـــدور فحواها حول التعامل الرياضى لتتابع القياسات النهائية للنتيجة بطريقة ما للوصول الى تركيز المادة المقاسة المجهولة التركيـــيز ويدخل ضمن هذا مايلـــــــى :

١ ـ رسم منحنى الخط المستقيم وتصحيحه وتقويمه وتحديـــد نهايته الصغرى والكبرى وقياس ميله التى تساوى ثوابـــت التحليل ·

٢ ـ التعامل مع المنحنيات التى ترسم على الورق البيانى فـــى الأجهزة التى تستخدم المسجل كأحد طرق عـــــرض النتيجة النهائية READ AUT وذلك بتحديد قمتها وعمل المنحنيات القياسية وتصحيحهـــــا ·

٣ ـ قياس المساحات تحت المنحنيات سواء القياسيـــــة

أو للعينات القاسة وتعبيرها •

٤ ـ تعديل انحدار وتعيير الخطوط القاعدية BASELINE

٥ ـ فصل المساحات المتداخلة في المنحنيات رياضيا •

٦ ـ قياس تركيز المواد المجهولة من تقدير المساحات تحت المنحنيات •

وأهم أسلوبين للتقدير الكمي هما :

١ ـ التقدير الكمي لمكونات العينة ككميات نسبية مباشرة •

٢ ـ التقدير الكمي لمكونات العينة بعد فصل هذه المكونات كميا وتقدير كمياتها المطلقة ثم اعادة تنسيبها •

وفي النوع الأول :

تكون العينة متجانسة ويقدر أحد مكوناتها أو بعضها أو جميعها كنسبة مئوية أو وحدات وزن في حجم أو وحدات وزن في وزن أو تركيزات جزيئية أو عيارية ٠٠٠٠٠٠٠ وهكذا •

وفى هذه الحالة تكون كل قطرة من محلول العينة مشابه تماما لكل بقية المحلول ، لذلك عند توقيعهـــا على المنحنيات يمثل تركيز أى مكون من مكوناتها أعلـــى نقطة أو أعلى تأثرا يتأثر به الجهاز المستخدم فـــى القياس كأن يكون أعلى امتصاصا ضوئيا بالنســـبة لأجهزة القياس الضوئى أو أقل نفاذية ضوئية فى مثل هذه الأجهزة أيضا أو أعلى كثافة لونية بالنسبة لأجهـــزة القياسات اللونية أو أعلى أو أدنى جهد كهربى لأجهـــزة قياس الاســـتقطاب ..... وهكذا .

وهذا التأثر عند أعلى أو أدنى حوله يمثل بيانيا بأعلى قراءة فى حالة رسم المنحنيات يدويا أو بأعلى قمـــة للمنحنى بالنسبة للمنحنيات المسجلة بواسطة أجهـــزة التحليل نفسها ومن خصائص هذا الأسلوب فى القيـــاس (التعبـــير) .

ان قراءة الجهاز أو ارتفاع المنحنى يظل ثابتـــا بعد وصوله الى أقصى حد له مهما ظل الجهاز عامـــلا علـــى نفـــس العينـــة عنـــد شـــروط تقديـــر نفـــس المكـــون .

أما فى النوع الثانى من أساليب القيـــاس :

فيتم فصل مكونات العينة ثم يقدر كل مكـــون منفصلا تقديرا كميا ثم يعاد نسبته الى حجم أو وزن العينة حسابيا أما دلالة قياس الجهاز فتكون بخصوص كل مكون على حدة ، وفى هذه الحالة تعد الأجهزة المهيئة لهذا الأسلوب بما يعرف بالتحليـــل الأوتوماتيكى متعـــدد القنوات MULTICHANEL AUTOMATIC ANALYSIS حيث يمر المكون المفصول المراد قياسه كميا بمعـــدل زمنى ثابت على وحدة القياس ((ضوئية كانت أو كهربيــة ...... أوغيرها)) لتظل ترســـل اشـــارتها المسجلة او المقروءة مادام المحلـــــول المـــار عليهـــا محتويـــا على المكون المفصول و بالتالى تشـــبه عـــلاقته الرياضيـــــة العلاقات الطبيعيـــــــــــــــــــــة

الأخرى المعروفة بيانيا ((بالمنحنى الطبيعى)) ومن ثم تعبر المساحة تحت المنحنى عن كميته وليس قمة المنحـــــنى .

ومن أمثلة هذا النوع من القياس القياسات الأوتوماتيكية لجميـــع التحليلات التى تعتمد على الفصل الكروماتوجرافى مثل عمل أجهـــــزة

(AAA) AMINO ACID ANALYZER

(GLC) GAS LIQUID

CHROMATOGRAPHY.

والألـكتروفوريـــز ...... وغيرها .

الفصــل الأول

تحـيم المنحنيـات القيـاسية الخطية

غالبا ماتكون العلاقة بين التركيز والقراءة READ OUT المتحصل عليها من أجهزة القياسات الدقيقة علاقة لوغاريتميـــــة ويتم معالجة هذه العلاقة لتمثيلها بيانيا بطريقتـــين :

الأول : أن يدرج تدريج الجهاز لوغاريتميا بحيث يعطي القراءة محولـــة الى أرقام لـوغاريتمية ثم تمثل بيـانيا على ورق بياني عادى متساوى المسافات .

الثاني : أن يدرج تدريج الجهاز عاديا متساوى الأقسام ثم يمثل علـى ورق بياني لوغاريتمي غير متساوى المســـافات .

والهدف من التحويل اللوغاريتمي للقراءات هو تحويل العلاقـــة البيانية بين الكثافة الضوئية (الامتصاص ـ الانفـاذ) والتركيز مـــن العلاقة المنحنية التي تشبه نصف القطع الناقص المقلوب الى علاقـــة خط مستقيم يكون ميله ثابتـا .

وسوف نكتفى هنا بمعالجة موضوع رسم منحنى الخط المستقيم وتقويمه
فى حالة استخدام الورق البيانى العادى والقراءات اللوغاريتمية للجهاز
حيث أنه النظام الأكثر انتشارا وشيوعا الآن ٠

طريقة رسم المنحنى القياسى الخطى

سوف نضرب لذلك مثالا باستخدام القياسات الضوئية حيث
تخضع لقانون بير ـ لامبرت الذى ينص على :

$$D = \text{Log}\ \frac{I_o}{I_t} = \epsilon TC$$

حيث D الكثافة الضوئية ((يمثلها قراءة الجهاز))

I_o شدة الضوء الساقط على العينة

T شدة الضوء النافذ منها

C سمك الوسط المار فيه الضوء خلال العينة ويقاس بـ "سم"
تركيز العينة اويقاس بالمول

ϵ (ابسلن) وهو معامل الخمود الجزيئى

ونظرا لأن الشائع فى استخدام هذه العلاقة القياسات مبنيا على

تثبيت T (سمك الوسط) باستخدام وعاء عينة ثابت المقطع .

نجد أن هذه المعادلة هي معادلة خط مستقيم بين الكثافة الضوئية (D) وبين التركيز (C) ويكون المعامل (ε) هو ميل هذا الخط المستقيم .

ومن خصائص هذا الخط أنه : (١) مستقيما
(٢) ويمر بنقطة الأصل .

وينشأ الخطأ في هذه الحالة عندما يفقد الخط الممثل لهذه العلاقة احدى خاصيتيه أو كليهما ، أي عندما لايكون مستقيما أو عندما لا يمر بنقطة الأصل .

أولا : تقويم العلاقة عندما لاتكون خطا مستقيما :

تمثل هذه العلاقة بمجموعة نقط (احداثيات) يمثل احداثيها السيني (التركيز) واحداثيها الصادي (القراءات اللوغاريتمية) للجهاز أي الكثافة الضوئية . وحالات الخطأ يتسبب عنها أحد أو بعض أو كل الاشكال التالية للعلاقة :

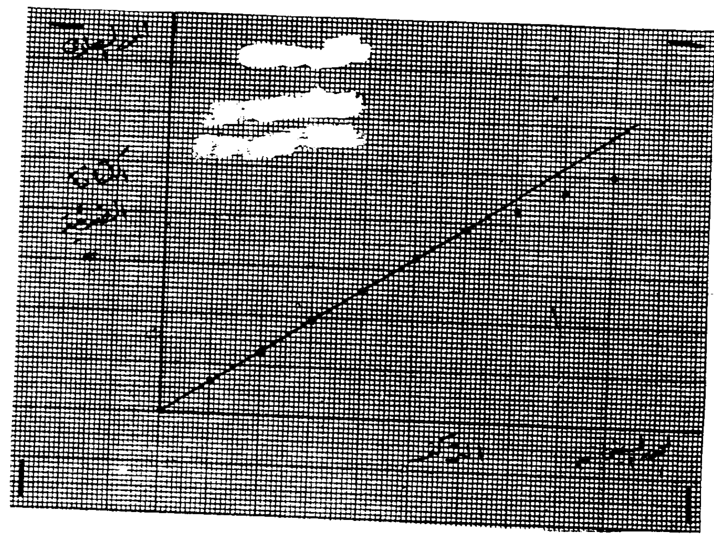
١ ـ الانخفاض النسبي المطرد للاحداثيات الصادية للنقط العليا :

وهي كما موضحة في شكل ٢٥٪ يكون ـ سببها أن عينات المحلول القياسي المتدرجة العليا تزيد عن حد التحليل ((مدى التحليل)) ((ANALYTICAL RANGE)) للمادة المقاسة •

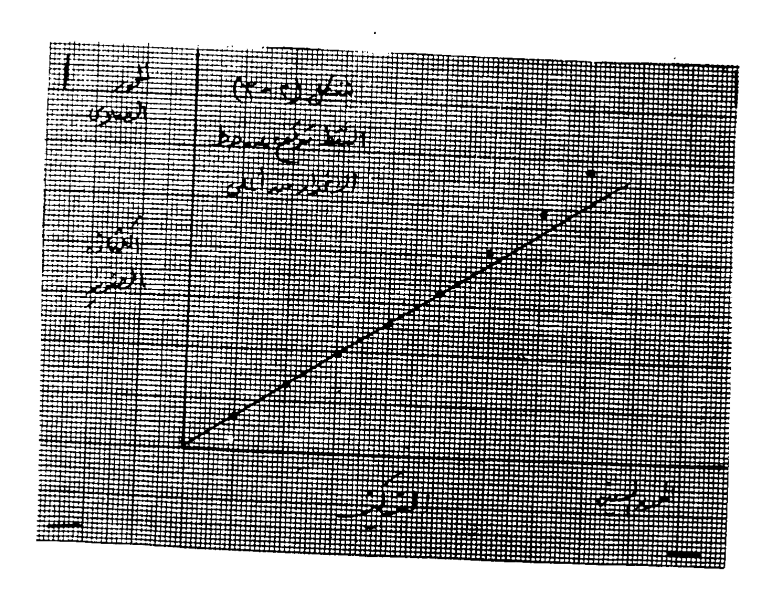
ولعلاج هذه الحالة يكتفى بآخر نقطة تقع على الخط المستقيم باعتبار أنها تمثل الحد الأعلى لمدى التحليل ، وتستبعد قياسات العينات المجتبرة التي تقع خارج (أعلى من) هذا الحد • اذ يجب تخفيف هذه العينات تخفيفات معلومة بحث تقع قراءاتها على الجهاز في مدى التحليل ، وعند حساب تركيزها بعد التخفيف يعاد حساب تركيزها الأصلي قبل التخفيف بضرب هذا التركيز المحسوب في مقلوب نسبة التخفيف •

٢ ـ الارتفاع النسبي المطرد للاحداثيات الصادية للنقط العليا :

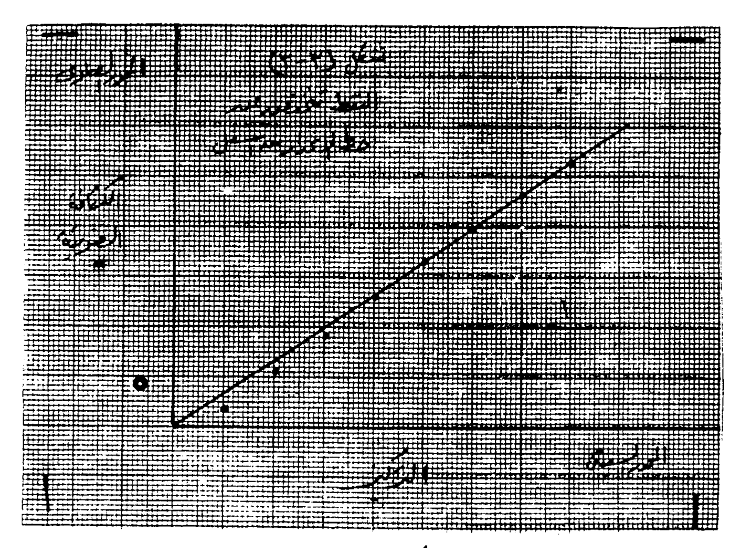
قد نحصل على شكل لتوقيع احداثيات



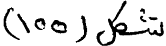
شكل (١٥٢)



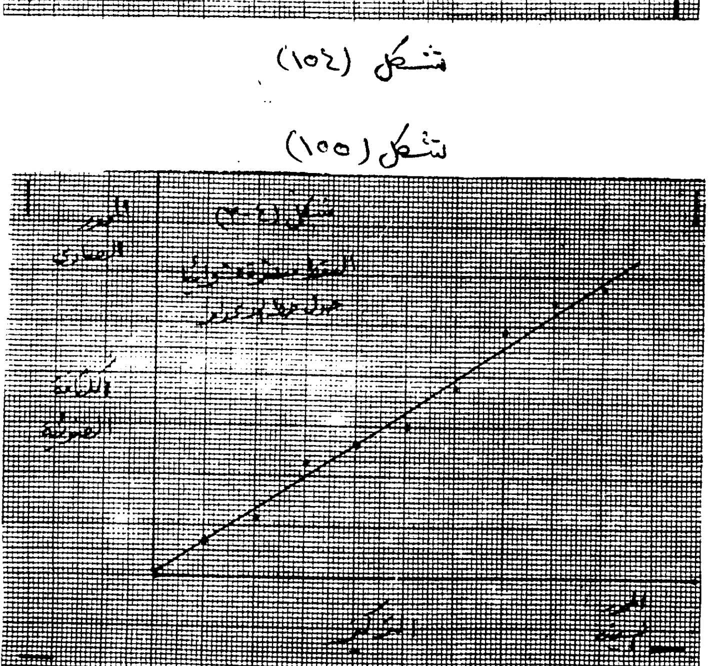
شكل (١٥٣)



شكل (١٥٤)



شكل (١٥٥)



النقط في المنحنى القياسي على شكل يشبه شكل (١٥٣) وفيه نلاحظ ارتفاع مطرد للاحداثيات الصادية للنقط العليا ، أو يشبه شكل (١٥٤) وفيه نلاحظ انخفاض الاحداثيات الصادية للنقط السفلى عن خط الانحدار ويكون سبب ذلك عدم ترك الجهاز الفترة الكافية لتسخينه وخاصة اذا كان المصدر الضوئي فيه يحتاج الى تسخين مناسب مثل المصادر الضوئية المستخدمة مع أجهزة

IR - SPECTROPHOTOMETERS

NIR - SPECTROPHOTOMETERS

ATOMEC ABSORPTION SPECTROSCOPY في

(H. C. T)

حيث أن شدة الاضاءة تزداد مع زيادة حرارة المصدر الضوئي وبالتالي يسجل الجهاز كثافة ضوئية أعلى عن تلك المسجلة قبل تمام تسخين المصدر الضوئي ، ولما كانت المحاليل الأعلى تقاس بعد المحاليل الأدنى لذلك تبدو بعيده عن خط انحدارها المنتظم .

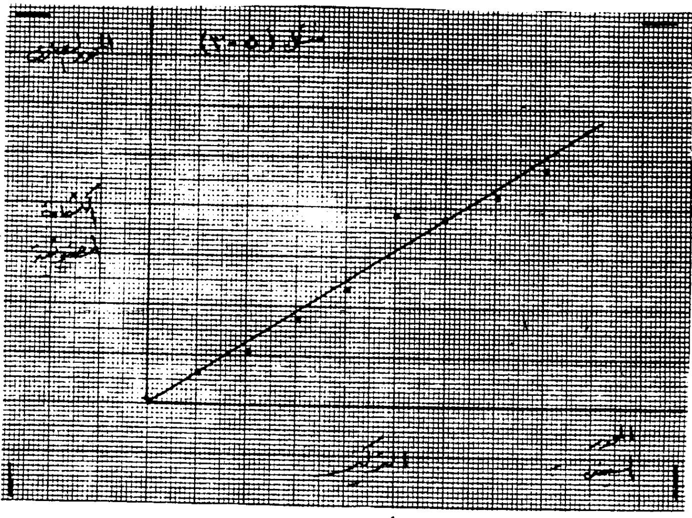
ولتلافي حدوث ذلك يترك الجهاز حتى
تمام التسخين مع الالتزام بالمدة المسجلة في
نشرة تشغيله واللازمة لاعداد الجهاز للعمل
ولزيادة تأكيد العمل يفضل بعد الانتهاء من
قراءة التركيزات المختلفة للمحلول القياسي
((عينات التعيير

اعادة قراءتهم مرة أخرى على الجهاز بطريقة
ترتيب معكوسة ٠

٣ ـ **تبعثر النقط حول خط مستقيم افتراضي :**

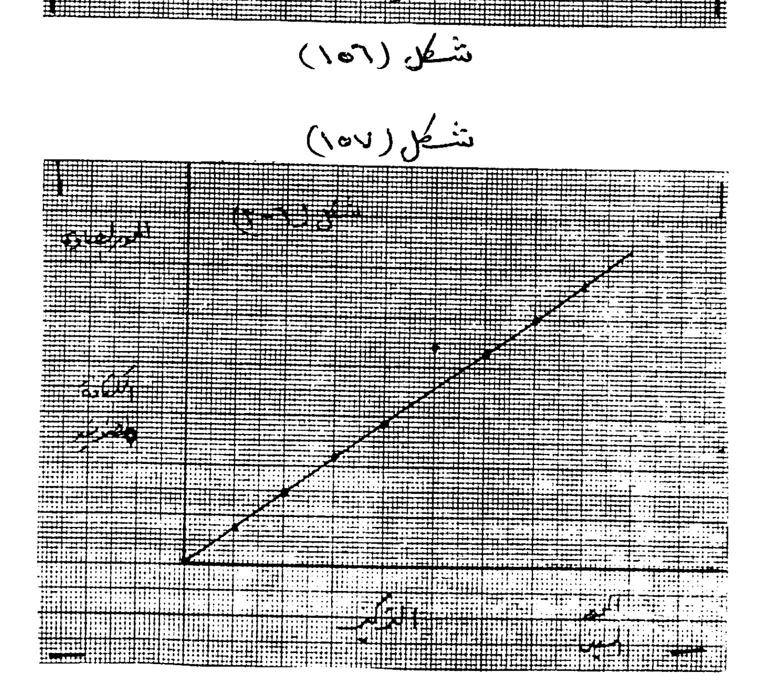
كما توضح الاشكال (٥٥\ ) ،
(٥٦\ ) ، (٥٧\ ) ٠

ويعنى ذلك أن هناك عدة أخطاء
عشوائية أو غير عشوائية نتيجة هفوات مختلفة
القيمة والاشارة وقد حدثت أثناء تحضير واعداد
المحاليل القياسية أو نتيجة تذبذب التيار
الكهربي (كما هو الحال في شكل " ٥٥\ ")
وفي هذه الحالة يجب اعادة العمل مرة أخرى



شكل (١٥٦)

شكل (١٥٧)



فاذا أعطت المحاليل الجديدة تبعثرات مشابهة فيمكن تقويم هذه العلاقة برسم المنحنى القياسى الذى يمثله خط الانحدار REGRESSION LINE لأحد المتغيرين على الآخر ((القراءات ، والتركيز)) .

أما اذا كان تبعثر النقط غير عشوائى تماما كأن تكون احدى هذه القيم تبعد بعدا ملحوظا فى أحد الاتجاهات بينما معظم النقاط الأخرى تبعد بعدا قليلا فى الاتجاه الآخر كما فى شكل (٥٦ \ ) . فيجب أن يعاد العمل مرة أخرى فاذا كانت النقاط الجديدة تمثل خطا مستقيما أو مبعثرة عشوائيا رسم الخط النواصل بينهما أو خط الانحدار الممثل لها حسب الحالة ، أما اذا ظلت نفس النقطة الخاصة بنفس التركيز شاذة باستمرار فى موقع أعلى أو أسفل دل ذلك على وجود خلل جسيم بالجهاز ويجب التوقف عن العمل به واستدعاء خبير لاصلاحه .

واذا كانت النقط تقع على خط مستقيم

فيما عدا نقطة واحدة أو نقطتين في اتجاه واحد
واحد أو في اتجاهين كما في شكل (٥٧)
دل ذلك على احتمال حدوث هفوة عرضية في
تحضير هذا التركيز بالذات أو يفضل في هذه
الحالة اعادة تحضير هذا التركيز فاذا لم
تصحح قيمته بعد اعادة قياسه تستبعد هذه
النقطة ويبقى على الخط الذى تقع عليه بقية
النقط .

ويفضل في هذه الحالة تلافي القياس على
هذا الخط عند هذا التركيز بالذات أو بالقرب
منه لاحتمال وجود عيب أو خلل في أجزاء
الجهاز تظهر عند هذا التركيز أو عند هفوة
القراءة . ويجب في هذه الحالة تخفيف
العينات المقاسة التي تقع كثافتها الضوئية عند
هذه المنطقة من الخط لتقع في المنطقة التي
تسبقها ، ثم تعاد حساب التركيز كما سبق بيانه .

ثانيا : تقويم العلاقة عندما لا يمر خطها بنقطة الأصل :

قد تقع النقط على خط مستقيم أو تتبعثر

عشوائيا حول خط الانحدار الذى لا يمر بنقطة الأصـــل

وانما يقطع المحور الصادى عند احداثى صادى موجـب

كما فى شكلى (٥٨ \ ) ، (٥٩ \ ) أو سالب

كما فى شكلى (٦٠ \ ) ، (٦١ \ ) وهذا

ينتج عن أخطاء ثابتة القيمة والاشارة منهــــا :

١ ـ وجود عيب بسيط فى أحد أجزاء الجهــاز ٠

٢ ـ استعمال فلـــتر (مرشح ضوئى) غير مناسب٠

٣ ـ وجود عيب شخصى فى القائم على التحليل مثـــل
((قصر نظر ـ حول ـ عمى ألوان)) ٠

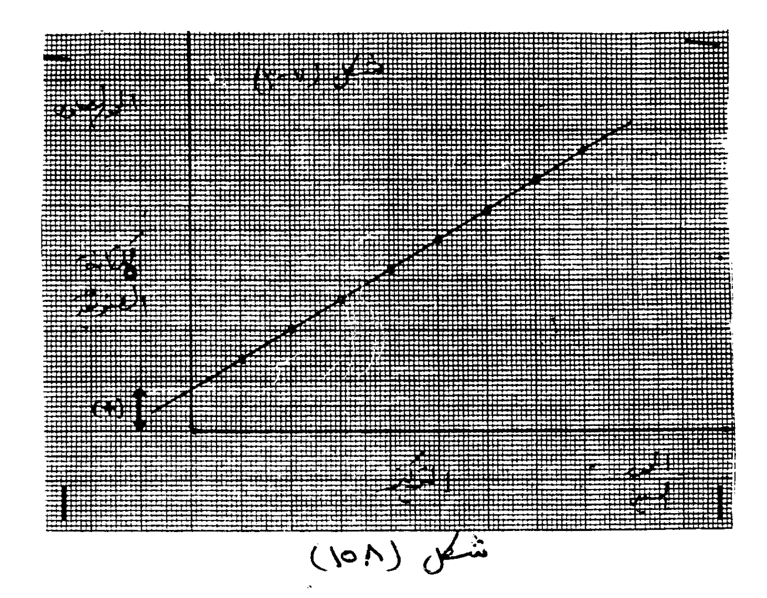
٤ ـ عدم دقة ضبط المؤشر على صفر التدريج ٠

٥ ـ عدم استخدام عينة معادلة خطأ المحـــوى
(BLANK) أو عدم تحضيرها بدقــة أو
احتوائها على نسبة من المادة القياســة ٠

٦ ـ وجود شـوائب فى المادة القياســية ٠

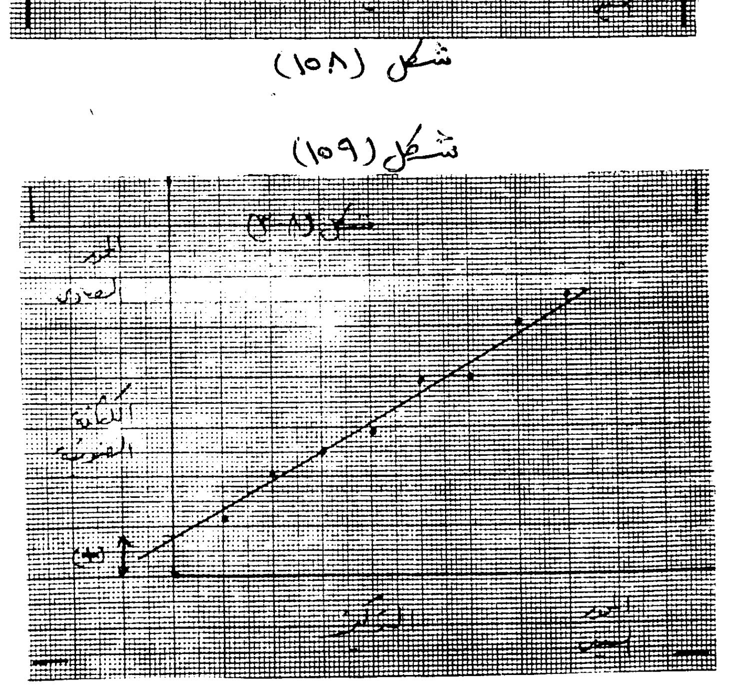
٧ ـ اختلاف درجة حرارة المحلول عن الدرجة المثلى
(كأن تكون أعلى حرارة أو أكثر برودة) ٠

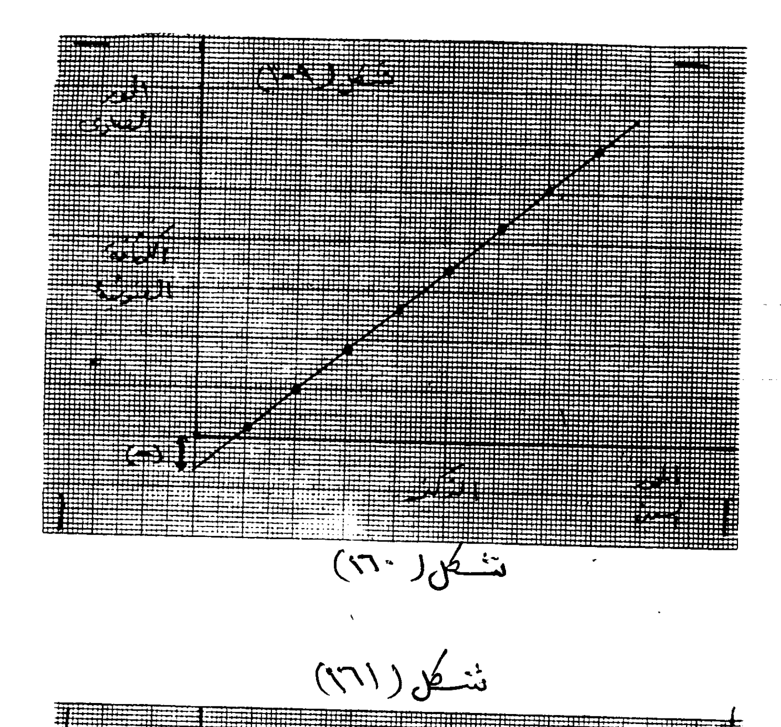
٨ ـ اتمام القياس على الجهاز قبل تمام تسخينه وتهيئته
للعمل وخاصة المصدر الضوئى الذى يحتاج الــى



شكل (١٥٨)

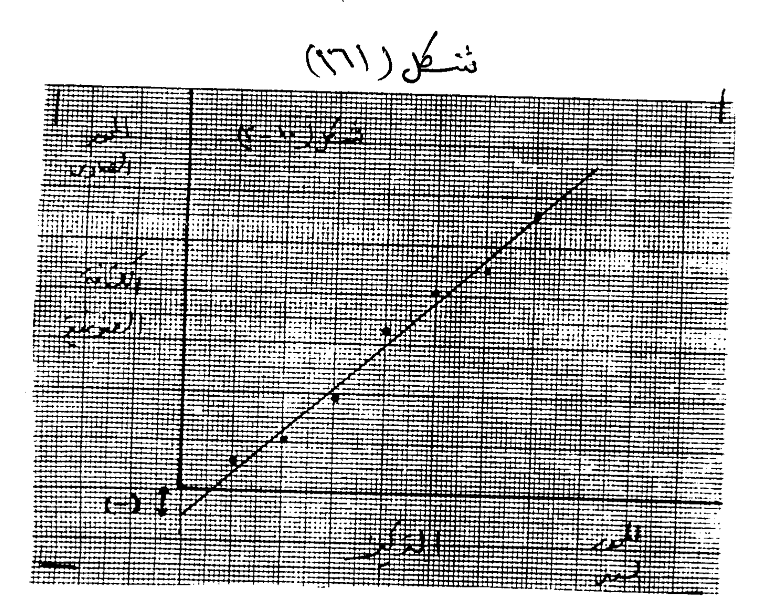
شكل (١٥٩)





شكل (١٦٠)

شكل (١٦١)



فترة تسخين ٠

وفي هذه الحالة يجب تلافي السبب اذا أمكن معرفته والتغلب عليه أما اذا كان مجهولا أو كان من الصعب التغلب عليه ، ففي هذه الحالة يمكن تصحيح الخطأ وذلك بمد الخط المستقيم المار بالنقط أو خط الانحدار الذى تتبعثر حوله القيم حتى تقطع المحور الصادى في نقطة حيث تقاس وتطرح باشارتها من جميع قراءات المحاليل القياسية (أى تضاف أو تخصم) ثم توقع القراءات المصححة على احداثياتها في المحاور من جديد ويرسم الخط المستقيم المار بنقطة الأصل أما اذا كان الخط المرسوم هو خط الانحدار فيرسم الخط المصحح موازيا له حتى يمر بنقطة الأصل وفي جميع الأحوال يجب اضافة أو خصم هذا التصحيح من قراءات جميع العينات المدروسة التي تستخدم مع هذا الجهاز في هذا اليوم ٠

تعيير المنحنى القياسي الخطي

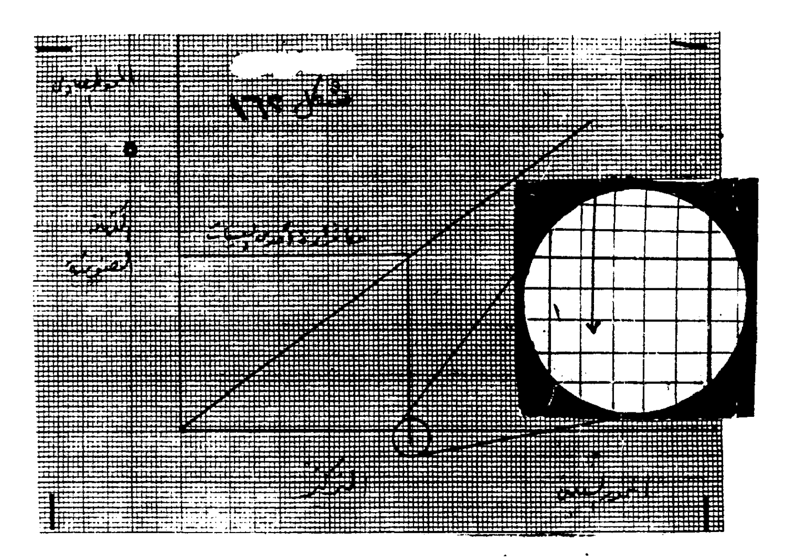
من الواضح أن مثل هذا المنحنى صالح لقياس العينات المدروسة

مباشرة بدون تقدير معامل التعيير . ولكن يتطلب الأمر فقط توقيع القياسات (القراءات) المقروءة من العينات على هذا المنحنى بمد خط موازى للمحور السينى عند تدريج القراءة حتى يقطع المنحنى القياسى فى نقطة ، يرسم مستقيما عموديا على المحور السينى من هذه النقطة حتى يقطعه عند التدريج الدال على التركيز المطلوب .

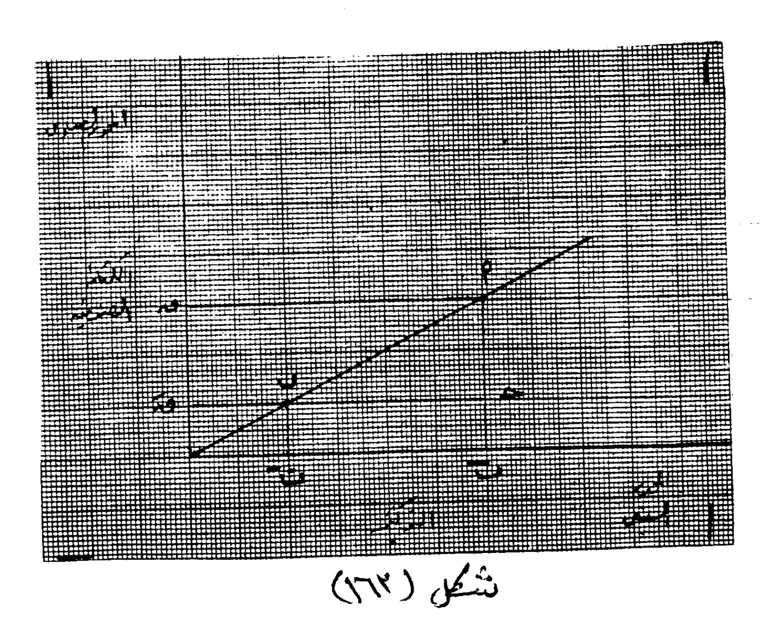
ومميزات هذه الطريقة أنه يحسب على أساسها التركيز مباشرة كما أنها تلزم القائم على التحليل بالقياس داخل مدى التحليل ANALYTICAL RANGE وبذلك لا يقع خطأ أو سهو فى هفوة القياس خارج هذا المدى حيث تستبعد القراءات التى لا تقع على خط المنحنى .

تقدير معامل التعيير

بسبب العيب السابق ذكره يفضل القياس بتقدير معامل التعيير. ويتم تقدير معامل التعيير اما بالقياس المباشر لعينة أو أكثر من عينات التعيير وبدون رسم المنحنى القياسى واما يقدر المنحنى القياسى ذاته وذلك كما يلى :



يلاحظ ان خط العمود الساقط على المحور السينى لا يقع على تدريجة كاملة كما هو واضح من الجزء المكبر ٠



شكل (١٦٢)

١ ـ تقدير معامل التعيير مباشرة :

يلجأ البعض لتقدير معامل التعيير مباشرة
وذلك دون عمل محاليل قياسية متدرجة التركيز
ودون عمل المنحنى القياسي ، وذلك باستخدام تركيز
واحد للمحلول القياسي (ت س) يستخدم كعينة تعيير
وتسجل له قراءة على الجهاز (ق س) ٠ ثم يحسب
منها معامل التعيير مباشرة حيث :

$$\text{معامل التعيير ((عت))} = \frac{ت_{س}}{ق_{س}}$$

ولكن هذا الأسلوب مع سهولته وسرعة اجرائه الا أنه يعاب عليه ما يلي:

١ ـ يعتبر قياسا غير مضبوط بالمقارنة باستخدام عدة تركيزات من المحلول القياسي ٠

٢ ـ يمكن الوقوع في خطأ الخروج عن مدى التحليل دون أن ندري الا اذا كانت طريقة التحليل تنص على تركيز المحلول القياسي بالتحديد بالنسبة لقياس مادة مدروسة محددة في عينات بعينها ٠

٣ ـ لايمكن به الكشف عن الأخطاء الثابتة الراجعة للباحث أو للجهاز أو لمادة التعبير .

ب ـ تقدير معامل التعبير من المنحنى القياسي :

تختار نقطتين على خط المنحنى القياسي :
سواء المرسوم مباشرة مع توصيل نقط الاحداثيات أو ممثل بخط الانحدار ، وذلك كما يوضح شكل (١٦،٢)
ولتكن أ ، ب ويرسم من أ مستقيمان :
أحدهما أ ق موازيا للمحور السيني ويقطع المحور الصادي في ق ، والثاني أ ت موازيا للمحور الصادي ويقطع المحور السيني في ت ، ويرسم من ب مستقيمان أيضا : أحدهما : ب قَ موازيا للمحور السيني ويقطع المحور الصادي في قَ والثاني ب تَ موازيا للمحور الصادي ويقطع المحور السيني في تَ . يتقاطع أ ت وامتداد قَ ب في جـ .

ولما كان معامل الخمود الجزيئي

ϵ = ميل الخط المستقيم للمنحنى القياسي

= ظا ∠ أ ب جـ = $\frac{\text{أ جـ}}{\text{ب جـ}}$ في المثلث أ ب جـ

$$\therefore \; € = \frac{\text{ق}\,\bar{\text{ق}}}{\text{ت}\,\bar{\text{ت}}} \;\ldots\ldots\ldots (١)$$

ولما كانت قيم $\bar{\text{ت}}$ ، $\bar{\text{ت}}$ قيم التركيز المئوى فى المحلول المحضر ، بينما € تقاس عند التركيز المولى فيمكن تحويل التركيز المئوى الى التركيز المولى

حيث $\text{ت} = \dfrac{\text{التركيز المولى عند ت} \times \text{الوزن الجزيئى}}{١٠}$

$$\bar{\text{ت}} = \frac{\text{التركيز المولى عند } \bar{\text{ت}} \times \text{الوزن الجزيئى}}{١٠}$$

$$\text{ت} - \bar{\text{ت}} = \frac{\text{الوزن الجزيئى}}{١٠} \left(\text{التركيز المولى عند ت} - \text{التركيز المولى عند } \bar{\text{ت}} \right)$$

فاذا رمزنا للوزن الجزيئى بالرمز (م) والتركيز المولى عند ت بالرمز $\text{ت}_{\text{م}}$ ، والتركيز المولى عند $\bar{\text{ت}}$ بالمز $\bar{\text{ت}}_{\text{م}}$

$$\therefore \; \text{ت} - \bar{\text{ت}} = \frac{\text{م}}{١٠} \left(\text{ت}_{\text{م}} - \bar{\text{ت}}_{\text{م}} \right)$$

$$\therefore \; \text{ت}_{\text{م}} - \bar{\text{ت}}_{\text{م}} = \frac{(\text{ت} - \bar{\text{ت}}) \times ١٠}{\text{م}} \;\ldots\ldots (٢)$$

وحيث أنه من المعادلة (١) $€ = \dfrac{\text{ق} - \bar{\text{ق}}}{\text{ت} - \bar{\text{ت}}}$

حيث ت ، $\bar{\text{ت}}$ مقدرة بالتركيز المولـــى

اى أن $\theta = \dfrac{\text{ق} - \bar{\text{ق}}}{\text{ت}_{\text{م}} - \bar{\text{ت}}_{\text{م}}}$

وبالتعويض عن قيمة ($\text{ت}_{\text{م}} - \bar{\text{ت}}_{\text{م}}$) فى المعادلة (٢)

$$\therefore \quad \theta = \frac{(\text{ق} - \bar{\text{ق}}) \times \text{م}}{(\text{ت} - \bar{\text{ت}}) \times ١٠} \quad ......(٣)$$

حيث ق ، $\bar{\text{ق}}$ قراءتين مختلفتين على المحور الصـــادى

ت ، $\bar{\text{ت}}$ التركيز المئوى المقابل للقراءتين ق ، $\bar{\text{ق}}$ بالترتيـــب

م الوزن الجزيئى للمادة المقـــاســة

$\because$ قانون بير − لامبرت ينص علـــى

الكثافة الضوئية $= \theta \times$ التركيز بالمـــول

$$= \theta \times \frac{\text{التركيز المئوى} \times ١٠}{\text{الوزن الجزيئى}}$$

فاذا رمزنا للكثافة الضوئية عند قراءة معينة بالرمز ق ع

والتركيز المئوى بالـــرمـــز ت ع

والوزن الجزيئى بالـــرمـــز م

$$\therefore \quad \text{ق}_{\text{ع}} = \frac{\theta \times \text{ت}_{\text{ع}} \times ١٠}{\text{م}}$$

$$\therefore \quad \text{ت}_{\text{ع}} = \frac{\text{ق}_{\text{ع}} \times \text{م}}{\theta \times ١٠}$$

أى أن $\text{ت}_{\text{ع}} = \text{ق}_{\text{ع}} \times \frac{\text{م}}{\times ١٠}$

وبالتعويض عن قيمة θ من المعادلة (٣)

$$\therefore \quad \text{ت}_{\text{ع}} = \text{ق}_{\text{ع}} \times \frac{\text{م} \times (\text{ت} - \bar{\text{ت}}) \times ١٠}{(\text{ق} - \bar{\text{ق}}) \times \text{م} \times ١٠}$$

$$\therefore \quad \text{ت}_{\text{ع}} = \text{ق}_{\text{ع}} \times \frac{\text{ت} - \bar{\text{ت}}}{\text{ق} - \bar{\text{ق}}} \quad \cdots\cdots (٤)$$

$$\text{و} \because \quad \text{ت}_{\text{ع}} = \text{ق}_{\text{ع}} \times \text{ع}_{\text{ت}} \quad \cdots\cdots\cdots (٥)$$

أى تركيز عينة ما = قراءة هذه العينة × معامل التعيير

من المعادلتين (٤) ، (٥) نستنتج أن

$$\text{ع}_{\text{ت}} = \frac{\text{ت} - \bar{\text{ت}}}{\text{ق} - \bar{\text{ق}}}$$

ويعتبر تقدير معامل التعيير بهذه الطريقة تقديرا مضبوطا مصححا للخطأ العشوائى .

الفصل الثاني

تقييم المنحنيات المسجلة علـــى الورق البياني بدلالـة قمـــة البيـــك

فى مثل هذه الأجهزة تسجل النتيجة النهائية للقياس READ OUT على شكل ((بيك)) رفيع جدا حاد الزاوية يعتبر ارتفاعه عن خط القاعدة BASE LINE عن الكثافة الضوئية أو الدلالة المعنية بالقياس كما فى شكل (١٦٤).

وغالبا مايكون الورق البيانى المستعمل مع المسجل ورقا بيانيـــا لوغاريتميا وفى هذه الحالة تقاس المسافة اللوغاريتمية بين قـمة البيـــك والخط القاعدة (ارتفاع البيك) كالآتـــى :

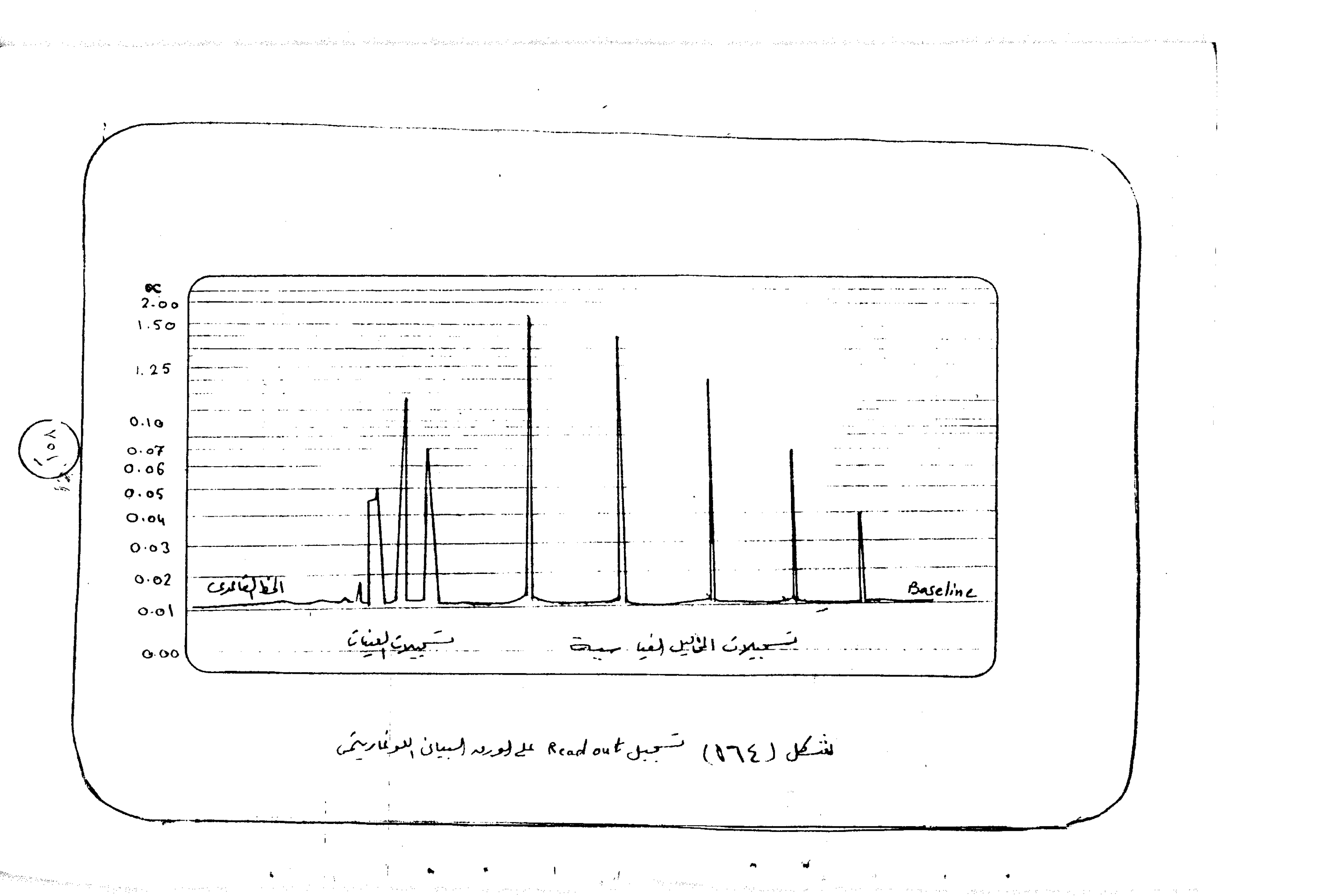
ع = ق ـ ب

حيث ع ارتفاع البيك ، ق قراءة التدريج البيانى اللوغاريتمى عند قمة البيك ، ب قراءة التدريج اللوغاريتمى للخط القاعـدى .

وفى الحقيقة تمثل القمة (ق) القراءة اللوغاريتمية وتمثل القاعدة

(ب) قراءة معادلة الخطأ بسبب المحوى (BLANK).

والقراءة المصححة هى باقى الطرح بينهما ، وهى التى تعامل معاملة القراءة على التدريج فى عداد الجهاز حيث تقدر لكل محول قياسى على حدة ثم تمثل بيانيا على ورق بيانى عادى وتعامل نفس معاملة المنحنيات القياسية الخطية التى سبق شرحها فى الفصل السابق .



شكل (٥٦٤) تسجيل Read out على الورق البياني اللوغاريتمي

الفصل الثالث

تقييم وتقدير المساحة تحت المنحنى البياني

تعتمد هذه الطريقة على مقارنة المساحة تحت المنحنى القياسي بالمساحة تحت المنحنى الخاص بالعينة المقاسة ((المختبرة)) بالنسبة للمركب الواحد ، وقد سبق أن علمنا أن هذا الاسلوب من أساليب التقدير البياني على الورق يتبع فى الأجهزة التى تعمل بالتحليل الاوتوماتيكى (التلقائى متعدد القنوات)

MULTICHANEL OUTOMATIC ANALYSIS

وهو يعتمد فى بعض خطواته على أحد أساليب الفصل الكروماتوجرافى ٠

ويعتبر (البيك) قريب جدا فى مساحته من مساحة المثلث وهى تساوى ((الارتفاع × القاعدة المتوسطة)) والقاعدة المتوسطة هى طول الخط الموازى للقاعدة الواصل بين ضلعى المثلث على بعد يساوى $\frac{1}{2}$ العمود الساقط من رأس المثلث الى الضلع الثالث ، وعلى ذلك تكون المساحة المحصورة تحت البيك :

س = ع × ى .... (١)

حيث   س   المساحة المحصورة تحت البيك

، ع   ارتفاع البيك عن القاعدة

، ص   القاعدة المتوسطة

وفى حالة الورق البيانى اللوغاريتمى يصعب أخذ هذه البيانات الطولية بالمسطرة ((أو بمعنى آخر بالتدريج المترى العادى)) وانما يجب حسابها من التدريجات اللوغاريتمية المبينة على الورق البيانى المعد لهذا الغرض وعلى ذلك تحسب كل من ع ، ص فى المعادلة (١) السابقة كما فى شكل (٦٦) .

١ ـ يقرأ التدريج الذى يقع عليه الخط القاعدى (ب)

٢ ـ يقرأ التدريج الذى تقع عليه قمة البيك (ق)

٣ ـ ع = ق ـ ب .... (٢)

٤ ـ يحسب نصف الارتفاع ($\frac{ع}{٢}$)

٥ ـ يحدد منسوب القاعدة المتوسطة (ن)

وهو ن = $\frac{ع}{٢}$ + ب ...... (٣)

٦ ـ تقاس المساحة الأفقية بين مصراعى البيك عند المنسوب بالقياس المترى العادى (ص)

٧ ـ تحسب المساحة تحت المنحنى (س) من المعادلة رقم (١) .

العامده المتوسط

ع

شكل (١٦٥)

∞
2.00
1.50
1.00
0.90
0.80
0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00

الخط الشاطئ

شكل (١٦٦)

مثال :

احسب المساحة تحت المنحنى للبيك الموضح فى شكل (٦٦)

الحـل :

ب = ٠٥ر

ق = ١٫٥٠

ع = ق ـ ب = ١٫٥٠ ـ ٠٥ر = ١٫٤٥

$\frac{ع}{٢} = \frac{١٫٤٥}{٢} =$ ٠٫٧٢٥

ن = $\frac{ع}{٢}$ + ب = ٠٫٧٢٥ ـ ٠٫٠٥ = ٠٫٧٧٥

س = ٠٫٣

م = ع × س = ١٫٤٥ × ٣ر = ٠٫٤٣٥

تقـدير معـامل التعيير

يمثل كل بيك فى المنحنى مركبا معينا معلوم التركيز فى المحلـول القياسى ، وبعد حساب المساحة تحت كل بيك فى المنحنى القياسى تعير هذه المساحة منسوبة للتركيز القيـاسى للمـادة المعايـرة (عينة التعيـير) حيـث :

$$\text{عت}_{\text{أ}} = \frac{\text{ت}_{\text{أ ق}}}{\text{س أ ق}}$$

حيث عت أ هو معامل التعيير للمكـــــون أ

، عت أ ق تركيز المكون أ فى المحلول القياسى

س أ ق المساحة تحت الهيك أ من المنحنى القياسى

مثال :

فى المثال السابق اذا كان هذا الهيك المرسوم فى شـكل (١٦٦) هو هيك حمض الاسبارتيك ASPARTIC ACID المقاس على جهاز (A A A). AMINO ACID ANALYZER

وتركيزه فى المحلول القياسى ٥٠ نانومتر / مل ووزنه الجزيئـــى الجرامى ١٣٢ جرام • احسب معامل التعييرله •

الحـل :

$$\text{ت} = \frac{١٣٢ \times ٥٠}{١٫٠٠٠٫٠٠٠٫٠٠٠} \quad \text{جرام / مل}$$

$$\text{عت} = \text{——} = \frac{١٠٠ \times ١٣٣ \times ٣٥٠}{١٫٠٠٠٫٠٠٠٫٠٠٠ \times ٤٣٥ر}$$

$$= ٠٠ر٠٠١٥١٧٢٤ \quad \text{نانومتر/مل}$$

$$= ١٥١٧ر٢٤ \quad \text{ميكروجرام/مل}$$

تقدير تركيز العينات المختبرة

تقدر المساحة تحت الهيك بالطريقة السابقة .

يحسب التركيز مباشرة حيث تـ أع = عتأ × س أع

حيث تـ أع = تركيز المكون أ في العينة ع

عتأ = معامل التعبير للمكون أ

س أع = المساحة تحت الهيك أ في العينة ع

مثال :

في المثال السابق احسب تركيز حمض الأسبارتيك في عينة اذا كانت مساحته تحت الهيك في منحناها كان ٠,٢٨٦

الحل :

حيث أن تـ ع = عت × س ع

∴ تـ ع = ١٥١٧,٢٤ × ٠,٢٨٦

= ٤٣٣,٩٣ ميكرو جرام / مل